

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A hőmérséklet hatásának tanulmányozása egy királis gyógyszermolekula analitikájában: HPLC és NMR technikák alkalmazása

Gerencsérné Berta Renáta

Témavezető: Dr. Gazdag Mária, PhD

ELTE konzulens: Perl Miklósné Dr. Molnár Ibolya, egyetemi tanár, professzor emerita



Doktori iskola: ELTE Kémia Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Inzelt György, egyetemi tanár

Program: Analitikai, kolloid- és környezetkémia, elektrokémia

Programvezető: Dr. Záray Gyula, egyetemi tanár



Richter Gedeon Nyrt.
Budapest
2014

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt. Kutatási Igazgatósága vezetőségének, hogy lehetőséget biztosított számomra a dolgozat elkészítéséhez.

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet és hálámat témavezetőmnek, dr. Gazdag Máriának, hogy hasznos szakmai tanácsaival segítette munkám sikeres elvégzését és a dolgozatom elkészítését. Szeretnék köszönetet mondani Babják Mónikának, hogy lehetőséget biztosított a mindennapi feladatok mellett a doktori munkám kísérleteinek elvégzésére és szakmai tanácsaival segítségemre volt. Köszönetet mondok Perl Miklósné dr. Molnár Ibolya professzor asszonynak, hogy összekötő kapocs volt számomra az egyetem és a gyógyszergyár között és a dolgozat összeállításánál is hasznos tanácsokkal látott el. Köszönettel tartozom dr. Szakács Zoltánnak az NMR mérésekben és a publikációk elkészítésében nyújtott segítségéért, valamint hogy az együtt gondolkodással segítette munkám előre jutását. Köszönetet mondok dr. Szántay Csabának, hogy lehetőséget biztosított az NMR mérések elvégzésére, valamint szakmai tanácsaival segítette munkámat. Köszönettel tartozom Mahó Sándornak a munkámhoz szükséges vegyületek biztosításáért. Szeretném megköszönni dr. Meszlényi Gábor kollégámnak és kolléganőinek a víztartalom mérésekben nyújtott segítségüket. Külön szeretném megköszönni Mihályfi Katalinnak, hogy segítségemre volt a HPLC rendszer gyakorlati alkalmazása közben felmerülő problémák megoldásában, segítette szakmai fejlődésemet. Köszönettel tartozom Kériné Kisfaludy Katalin kolléganőmnek, hogy a kísérleti munka elvégzésében segítségemre volt. Külön köszönöm Varga-Oláh Erzsébetnek a segítségét és a biztató szavait. Köszönettel tartozom a Kutatási Analitikai Osztály minden kedves dolgozójának.

Hálás szívvel köszönöm szüleimnek a sok gondoskodást, támogatást, ami elkísért a tanulmányaim során. Tiszta szívvel köszönöm férjem kitartó türelmét és a mindennapi feladatokban nyújtott segítségét. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm gyermekeim megértését, hogy a dolgozat elkészítése miatt nélkülözniük kellett.

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK.....	5
2. BEVEZETÉS	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	8
3.1. AZ EMELT HŐMÉRSÉKLETŰ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIA (HTLC)	8
3.1.1. Elméleti megfontolások	8
3.1.1.1. <i>Az oszlophatékonyság hőmérsékletfüggése.....</i>	<i>9</i>
3.1.1.2. <i>A hőmérséklet hatása a visszatartási tényezőre.....</i>	<i>10</i>
3.1.2. Termosztát	11
3.1.3. Oszlop.....	14
3.1.4. Az irodalomban vizsgált vegyületek áttekintése	16
3.2. A CIKLODEXTRINEK	17
3.2.1. A ciklodextrinek története és alkalmazásai	17
3.2.2. A ciklodextrinek tulajdonságai	18
3.2.3. A ciklodextrin-komplexek	20
3.2.3.1. <i>A komplexképződés egyensúlyi leírása</i>	<i>20</i>
3.2.3.2. <i>A képződő komplexek sztöchiometriai vizsgálata</i>	<i>21</i>
3.2.3.3. <i>A stabilitási állandók meghatározása elválasztástechnikai módszerekkel</i>	<i>23</i>
3.2.3.4. <i>A stabilitási állandók meghatározása NMR titrálással</i>	<i>25</i>
3.2.3.5. <i>A komplexképződés termodinamikája</i>	<i>26</i>
3.2.3.6. <i>A CD-komplexek szerkezeti jellemzése</i>	<i>28</i>
3.2.4. Az enantiomerek ciklodextrin-komplexei	30
3.2.4.1. <i>Enantioszelektív komplexstabilitási állandók meghatározása oldatfázisban HPLC-vel</i>	<i>31</i>
3.2.4.2. <i>Enantioszelektív komplexstabilitási állandók meghatározása NMR titrálással</i>	<i>32</i>
3.2.5. A ciklodextrinek analitikai felhasználása	34
3.3. A KIRÁLIS FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS ELVÁLASZTÁSOK	35
3.3.1. Az optimális elválasztási körülmények előrejelzésének lehetőségei	36
3.3.2. A hőmérséklet szerepe az enantiomerek elválasztásában.....	37
3.4. LEVONORGESTREL	38

3.4.1. A Levonorgestrel akirális és királis analitikája	39
4. CÉLKITŰZÉSEK	40
5. AZ ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK LEÍRÁSA.....	41
5.1. FELHASZNÁLT VEGYSZEREK.....	41
5.1.1. Vizsgált vegyületek	41
5.1.2. Ciklodextrinek	43
5.1.3. Oldószerek, eluensek	43
5.2. ANALITIKAI MÓDSZEREK	43
5.2.1. Akirális HPLC	43
5.2.2. Királis HPLC	44
5.2.3. A víztartalom meghatározása	45
5.2.4. Az NMR mérések és kiértékelésük	45
6. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK.....	48
6.1. EMELT HŐMÉRSÉKLETŰ FOLYADÉKKROMATOGRÁFIÁS MÉRÉSEK AKIRÁLIS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT.....	48
6.1.1. Összefüggés a retenció és a szerkezet között	49
6.1.2. A hőmérséklet hatásának tanulmányozása	53
6.1.3. A mozgófázis szerves összetevőjének szerepe	56
6.1.4. Az áramlási sebesség vizsgálata	58
6.1.5. A retenciós idő előrejelzése	61
6.1.6. Eredmények, következtetések	62
6.2. A NORGESTREL ENANTIOMEREK ÉS A NATÍV CIKLODEXTRINEK	63
6.2.1. HPLC kísérletek natív ciklodextrinekkel	63
6.2.1.1. <i>A hőmérsékletváltozás tanulmányozása γ-CD szelektorról</i>	<i>65</i>
6.2.1.2. <i>A mozgófázis ciklodextrin és metanol tartalmának hatása az elválasztásra</i>	<i>69</i>
6.2.2. A natív CD-kel képzett komplexek NMR vizsgálatai	73
6.2.2.1. <i>α-CD hatása.....</i>	<i>74</i>
6.2.2.2. <i>β-CD hatása.....</i>	<i>75</i>
6.2.2.3. <i>γ-CD hatása</i>	<i>77</i>

6.2.3. A kialakult zárványkomplex szerkezete	80
6.2.4. A γ -ciklodextrinnel kapott HPLC és NMR eredmények összehasonlítása	82
6.2.5. Eredmények, következtetések	84
6.3. ELŐKÍSÉRLETEK PERMETILEZETT CIKLODEXTRINEKKEL	85
6.3.1. A mozgófázisban alkalmazott permetilezett ciklodextrinek	85
6.3.2. PM-CD és a Norgestrel enantiomerek kötődésvizsgálata NMR titrálásokkal.....	88
6.3.2.1. A PM- α -CD-vel kialakult komplexek vizsgálata.....	88
6.3.2.2. A PM- β -CD-vel kialakult komplexek vizsgálata.....	91
6.3.2.3. A PM- γ -CD-vel kialakult komplexek vizsgálata	94
6.3.3. Állófázishoz kötött PM-CD-kel végzett előkísérletek.....	97
6.3.4. Eredmények, következtetések	99
7. ÖSSZEFOGLALÁS	100
8. TÉZISEK, ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	103
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	105
RÖVID ÖSSZEFOGLALÁS.....	113
SUMMARY.....	115

1. Rövidítések

ACN	acetonitril
CD	ciklodextrin
α -CD	α -ciklodextrin
β -CD	β -ciklodextrin
γ -CD	γ -ciklodextrin
	} natív ciklodextrinek
CE	kapilláris elektroforézis (<u>C</u> apillary <u>E</u> lectrophoresis)
DS	átlagos szubsztitúciófok / CD gyűrű (<u>d</u> egree of <u>s</u> ubstitution)
ESI-MS	elektrospray ionizációs tömegspektrometria (<u>E</u> lectro <u>S</u> pray <u>I</u> onization <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry)
GC	gázkromatográfia (<u>G</u> as <u>C</u> hromatography)
HPLC	nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia (<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
HSQC	heteronukleáris egy kvantum koherencia (<u>H</u> eteronuclear <u>S</u> ingle <u>Q</u> uantum <u>C</u> oherence)
HTLC	emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia (<u>H</u> igh- <u>T</u> emperature <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography)
MeOH	metanol
NMR	mágneses magrezonancia spektroszkópia (<u>N</u> uclear <u>M</u> agnetic <u>R</u> esonance)
NOESY	atommagok közötti Overhauser-hatáson alapuló NMR spektroszkópiai módszer (<u>N</u> uclear <u>O</u> verhauser <u>E</u> ffect <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>)
PM-CD	permetilezett ciklodextrin
PM- α -CD	permetilezett- α -ciklodextrin
PM- β -CD	permetilezett- β -ciklodextrin
PM- γ -CD	permetilezett- γ -ciklodextrin
ROESY	forgó koordinátarendszerben végrehajtott NOESY kísérlet (<u>R</u> otating-frame <u>O</u> verhauser <u>E</u> ffect <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>)
SFC	szuperkritikus fluid kromatográfia (<u>S</u> upercritical <u>F</u> luid <u>C</u> hromatography)

TLC	vékonyréteg kromatográfia (<u>T</u> hin <u>L</u> ayer <u>C</u> hromatography)
TOCSY	teljes korrelációs spektroszkópia (<u>T</u> Otal <u>C</u> orrelation <u>S</u> pectroscop <u>Y</u>)

2. Bevezetés

A gyógyszerkutatás folyamata akár 10–15 évet is felölel a kezdeti szintézistől egészen az új gyógyszerkészítmény forgalomba kerüléséig. A megoldandó feladatok növekvő száma, valamint a feladatok bonyolultsága miatt a kutatási fázisban és a rutin analitikában is fontos szerepet kapnak a gyors és hatékony analitikai módszerek. Az anyagok tisztaságára vonatkozó hatósági, gyógyszerkönyvi követelmények is egyre szigorodnak, ami szükségessé teszi a kisebb kimutatási határ elérését, érzékenyebb módszerek kidolgozását.

Napjainkban a gyors kromatográfiás technikák virágkorát éljük. Szinte hónapról-hónapra jelennek meg az új állófázisok, az egyre nagyobb nyomás- és egyre szélesebb hőmérséklet-tartományban működő készülékek. A megjelent publikációk nagy száma is mutatja a gyors kromatográfia, azon belül is az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia (High-Temperature Liquid Chromatography, HTLC) széles alkalmazási körét, nem csak az akirális, hanem a királis összetevők elválasztására is. A folyadékkromatográfia elméleti feltételei a HTLC technikában is változtatások nélkül alkalmazhatók. A visszatartási tényező változása a hőmérséklettel információt ad a mozgó- és az állófázis közötti egyensúlyi folyamatok termodinamikai paramétereiről mind az akirális, mind a királis rendszerekben. A királis elválasztásokban a gazda-vendég molekula kölcsönhatása miatt az elválasztás mechanizmusa összetettebb folyamat, ezért nehéz előre jelezni, hogy az enantiomerek elválasztására melyik királis szelektor alkalmas. Ehhez nyújthat segítséget az NMR technika.

Doktori munkámban vizsgáltam az elméleti összefüggéseket szélesebb hőmérséklet-tartományban a Norgestrel hatóanyag és szennyezéseinek akirális elválasztása során. Királis hatóanyag révén, az enantiomerek elválasztási mechanizmusának megértéséhez, a szerkezeti összefüggések magyarázatára HPLC és NMR technikákat használtunk.

Kísérleti munkám során a HPLC méréseket, azok kiértékelését, a következtetések megállapítását magam végeztem, míg az NMR mérések, azok kiértékelése és értelmezése a Szerkezetkutatási Osztály munkatársával, Dr. Szakács Zoltánnal együttműködve készültek. A disszertációban így a saját eredményeim bemutatásánál egyes számot, míg az NMR-s együttműködés eredményeinek leírásánál többes számot használok.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia (HTLC)

3.1.1. Elméleti megfontolások

A HTLC már 1969 óta ismert, amikor is Maggs és munkatársai vizsgálták a hőmérséklet hatását a kismolekulák [1], Horváth Csaba és munkatársai a biopolimerek elválasztására [2]. Ezen úttörő tanulmányokat követően az emelt hőmérséklet a rutin analitika számára feledésbe merült és csak az ezredforduló után élénkültek meg a vizsgálatok. A HTLC technika az emelt hőmérsékletet használja ki az elválasztás felgyorsításához a hatékonyság romlása nélkül [3-6]. Az emelt hőmérsékletnek többféle definíciója ismert („magasabb a szobahőmérsékletnél”, „magasabb a mozgófázis oldószerének forráspontjánál” vagy „>100°C”), egységes hőmérsékletatról, vagy hőmérséklet-tartományról nem beszélhetünk [7]. Tekintettel arra, hogy ma még a magyar szakmai szóhasználat sem egységes és megállapodott erre a területre [8], egyaránt használják a magas hőmérsékletű, a nagy hőmérsékletű és az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia elnevezést. Dolgozatomban ezért az emelt hőmérséklet megnevezés használatát választottam. A hőmérséklet emelésével megváltozik az elválasztás néhány fizikai-kémiai kulcsparamétere, például az eluens (mozgófázis) viszkozitása, polaritása és a diffúzió is. Emiatt az áramlási sebesség növelhető, mellyel rövidebb analízis időt kaphatunk. A kis szemcseméretű oszlopok, állófázisok alkalmazása is lehetővé válik, hiszen a viszkozitás csökkenés hatására kisebb lesz a nyomáscsökkenés a kolonnán.

3.1.1.1. Az oszlophatékonyság hőmérsékletfüggése

Amint az irodalomból ismert, az elméleti tányérmagasságot (H), ami az elválasztás hatékonyságát jellemzi, a mozgófázis lineáris áramlási sebességével (u) tudjuk optimalni, a van Deemter egyenletnek megfelelően:

$$H = A + B/u + Cu \quad (1)$$

ahol A az Eddy diffúziós együttható, B a longitudinális diffúziós együttható, míg a C az anyagátadási ellenállásra jellemző együttható. Az egyenletben szereplő lineáris áramlási sebesség értékét a következő egyenlet szerint számíthatjuk:

$$u = F_v / \pi R_c^2 \varepsilon_T \quad (2)$$

ahol F_v az áramlási sebesség (ml/perc), R_c az oszlop sugara (cm) és ε_T az oszlop teljes porozitása [9].

A van Deemter egyenlet A , B és C együtthatói:

$$A = 2\lambda d_p \quad (3)$$

$$B = 2\gamma D_m \quad (4)$$

$$C = C_m + C_s = \frac{1+6k+11k^2}{24(1+k)^2} \cdot \frac{d_p^2}{D_m} + \frac{8}{\pi^2} \cdot \frac{k}{(1+k)^2} \cdot \frac{d_f^2}{D_s} \quad (5)$$

ahol λ a töltetre jellemző állandó, d_p a töltet átlagos szemcseátmérője, γ a töltésnek köszönhető egyenetlenségre jellemző állandó, D_m az oldott anyag diffúziós együtthatója a mozgófázisban D_s az oldott anyag diffúziós együtthatója az állófázisban, k a visszatartási tényező és d_f az állófázis átlagos filmvastagsága [10].

Az A együttható hőmérséklettől független, de várható, hogy az emelt hőmérséklet javítja a lamináris áramlást és a laterális komponenskeveredést a különböző áramlási csatornában a növekvő diffúzió következtében, azonban a javulás nem számottevő [11]. Tehát az A együtthatóra, ami azt mutatja, hogy milyen jól töltött az oszlop, nincs nagy hatása a hőmérséklet-emelésnek.

A longitudinális diffúziós együttható, B , a molekula szemcsék közötti axiális diffúzióját írja le. A kis lineáris áramlási sebességnél van jelentősége és értéke nő a hőmérséklettel. Wilke és

Chang [12] szerint a molekula diffúziós együtthatóját (D_m) a következő megközelítéssel írhatjuk le:

$$D_m \approx [(\Psi_2 M_2)^{0.5} / \eta V_1^{0.6}] T \quad (6)$$

ahol T az oszlop abszolút hőmérséklete, M_2 az oldószer moláris tömege, V_1 a minta moláris térfogata a normál forráspontján (cm^3/mol), η a dinamikus viszkozitása (cP), Ψ_2 az oldószer asszociációs faktora, amely nempoláris oldószerre 1, metanolra 1,9 és a vízre 2,6. A (6) egyenletből megállapítható, hogy a molekula diffúziója egyenesen arányos a hőmérséklettel és fordítottan arányos a viszkozitással, ez azt jelenti, hogy a hőmérséklet emelésével a komponens diffúziója a mozgó- és az állófázisban nő. Az Arrhenius-összefüggés szerint a viszkozitás exponenciálisan csökken a hőmérséklet növelésével, ami a vizsgálandó vegyület diffúzióját tovább növeli.

A C együttható az anyagátadást (adszorpciós/deszorpciós kinetikát) jellemzi az álló- és a mozgófázis között. A hőmérséklet emelésével a C együttható csökken, mivel a molekula diffúziója a mozgó- (D_m) és az állófázisban (D_s) a hőmérséklet-emelés hatására megnő. A hőmérséklet növelésével az elméleti tányérmagasság tehát csökken. A van Deemter görbe minimum pontja a nagyobb lineáris áramlási sebességek irányába tolódik el a hőmérséklet emelésével és a görbe felszálló ágának meredeksége is csökken. Mindezekkel ellentétben ismert olyan irodalmi eredmény is, ahol az oszlop hatékonysága nem változik a hőmérséklet emelésével, ill. csökken lassú kinetikájú rendszerben [2,13].

3.1.1.2. A hőmérséklet hatása a visszatartási tényezőre

A hőmérséklet emelésével a szelektivitási értékek is megváltozhatnak. és a retenció idő csökken a fordított fázisú kromatográfia esetén. A hőmérséklet visszatartási tényezőre (k) gyakorolt hatását a van't Hoff egyenlettel írhatjuk le:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (7)$$

$$\ln k = -\Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R + \ln \Phi \quad (8)$$

ahol t_R a vizsgált komponens retenció ideje, t_0 a holtidő, ΔH° a mozgófázisból az állófázisba történő anyagátadást kísérő entalpiaváltozás, ΔS° a standard entrópiaváltozás, T az abszolút

hőmérséklet és Φ a fázisarány. Az $1/T$ függvényében az $\ln k$ lineáris összefüggést mutat, melynek meredekségéből $(-\Delta H^\circ/R)$ az anyagátadás entalpiája, tengelymetszetéből $(\Delta S^\circ/R + \ln \Phi)$ az entrópiája számítható. Az irodalomból ismert legtöbb kísérlet során csak szűk hőmérséklet-tartományban vizsgálták az elválasztások hatékonyságát és a 80°C feletti tartományra is csak kevesen tértek ki [14-18]. A van't Hoff összefüggés emelt hőmérséklet-tartományban is jól leírja az anyagtranszfer kinetikáját [19,20].

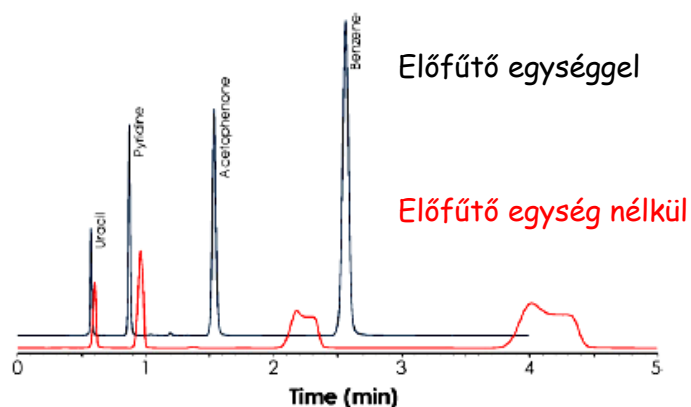
A semleges vegyületekre általában lineáris összefüggést kaptunk a van't Hoff egyenlet szerint. Számos vegyület rendelkezik ionizálható, poláris funkciós csoporttal, ezekben az esetekben az alkalmazott mozgófázis szerves összetevője [21,22], a mozgófázis pH értéke [23] befolyásolja a retenciót, vagyis a kölcsönhatások erősségét, ezzel nem lineáris összefüggést ad a hőmérsékletre. A (8) egyenlet értelmezése szerint, ha az anyagátadási entalpia- és entrópiaváltozás független a hőmérséklettől, akkor az összefüggés egyenest eredményez.

Az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia nagy előnye, hogy a hatékonyság növelésével adott idő alatt nő az elválasztható komponensek száma, így az analízisidő csökkenthető. Fontos gazdasági és környezetvédelmi szempont, hogy a mozgófázis szerves összetevőjének mennyisége is csökkenthető, vagyis gyakorlatilag akár tiszta vízzel is lehet kromatografálni [24]. Az alkalmazásának határt szab egyrészt a készülék és az oszlop hőterheléstűrő képessége, másrészt a vizsgálandó vegyület hőstabilitása.

3.1.2. Termosztát

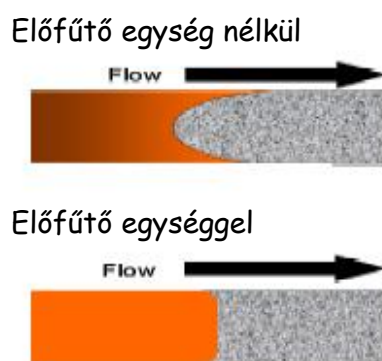
A folyadékkromatográfias rendszerek nélkülözhetetlen tartozéka az állandó hőmérsékletet biztosító oszloptermosztát. A reprodukálható elválasztások feltétele az azonos hőmérsékleten végzett analízis, ami az állófázis/oszlop termosztálásával valósítható meg. Az emelt hőmérséklet alkalmazása még inkább megkívánja a hőmérséklet pontos értéken tartását, hiszen 1–2°C különbség is jelentős retenciós idő csúszást eredményezhet.

A megfelelő termosztát alkalmazásán túl fontos tényező a mozgófázis előfűtése az oszlopra kerülés előtt és az oszlopról távozó oldószer lehűtése a detektor hőmérsékletére. A mozgófázis előfűtésére 80°C felett már szükség van a csúcskiszélesedés, esetleg a csúcsfelhasadás elkerülése céljából [25-27].



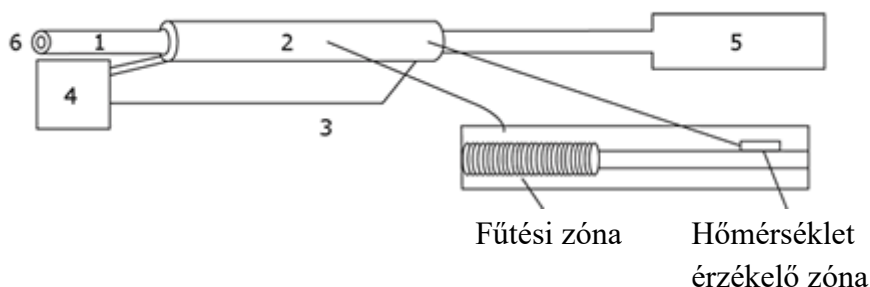
1. ábra A mozgófázis előfűtésének szerepe [27]

Vanhoenacker és társai előfűtő egység nélkül (1. ábra) a kromatográfiás csúcsok felhasadását tapasztalták 150°C hőmérsékleten ET-RP1 oszlopon az alkalmazott teszt elegyek (uracil, piridin, acetofenon, benzol) vizsgálatakor [27].



2. ábra Az áramlási profil változása előfűtő egység alkalmazásakor, ill. anélkül
<http://www.selerity.com/main/Documents/TechNote803.pdf>

A fűtött oszlop és az előfűtés nélkül rákerülő mozgófázis hőmérséklete eltér. Az oszlop falánál levő mozgófázis hőmérséklete nagyobb, mint az oszlop belsejében levő, így a viszkozitása az oszlop falánál kisebb, mint a közepében. Ez azt eredményezi, hogy a fal mentén a mozgófázis gyorsabban mozog (2. ábra), ezért az eltérő sebesség csúcshélesedést és a csúcselbontás romlását okozhatja.



3. ábra Polaratherm előfűtő egység felépítése: 1. rozsdamentes acél vezeték, 2. fűtőegység, 3. termoelem érzékelő, 4. hőmérséklet-szabályozó, 5. oszlop, 6. pumpáról érkező vezeték;
http://www.selerity.com/main/images/preheating_drawing_full.gif

A 3. ábrán az előfűtő egység látható, ahol a pumpa által szállított mozgófázis az előfűtő egység után kerül az oszlopra. Az előfűtő egység egy fűtőzónából és egy hőmérséklet-érzékelőből épül fel. A hosszabb előfűtő egység jobb csúcsalakot eredményezett Fields és munkatársainak kísérletei szerint [28]. Míg Teutenberg és munkatársai megállapították, hogy a mozgófázis és a fűtőblokk hőmérséklete közötti kis különbség még gyors áramlási sebességnél sem okoz csúcsszélesedést [29].

A gyártók garantálják a pontos hőmérséklettartást ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) a termosztátokban, azonban arról sehol nem beszélnek, hogy a készüléken beállított hőmérséklet ténylegesen hány fokot jelent az oszlop belsejében egy adott ponton. Ha különböző készüléket használunk adott komponensek elválasztásra, előfordulhat retenciós idő különbség. Spearman és munkatársai a módszer átadás kérdését vizsgálták és megállapították, hogy szükséges megadni a vizsgálat során használt készülék típusát is a reprodukálhatósághoz [30].

A HTLC kutatások kezdetén még nem állt rendelkezésre megfelelő termosztát, így házilag készített olajfürdő, vízfürdő szolgált az oszlop emelt hőmérsékleten tartására. Ezeknél a készülékeknél problémát jelentett a reprodukálhatóság és a megfelelő csúcsalak elérése. Nagy előrelépést jelentett a GC készülékekből ismert fűtőblokkok alkalmazása. Ezek alapján különböző gyártók fűtőblokkjai, termosztátjai jelentek meg a piacon. Teutenberg és munkatársai elsőként állítottak össze olyan készüléket [29] - az elméleti megfontolásokat figyelembe véve -, amely alapja a ma kereskedelemben kaphatónak. A XXI. század elején mindösszesen két, különálló, nem készülékbe építhető termosztát állt rendelkezésünkre. A Metalox™ 200°C (ZirChrom Separation, Anoka, MN, USA) [31] izoterm körülmények között, míg a Polaratherm Series 9000 (Selerity, Salt Lake City, UT, USA) [32] programozható hőmérsékleten is alkalmazható. Mindkét készüléknél lehetőség van a

mozgófázis előfűtésére, valamint az oszlop utáni hűtésére is. Napjainkban már több olyan HPLC készülék is rendelkezésünkre áll, amelyeknél az oszloptermosztát beépített egységként, optimalizált paraméterekkel használható. Az Agilent Infinity 1200 készülék működési hőmérséklet-tartománya szobahőmérséklet mínusz 10°C-tól 100°C-ig ($\pm 0,05^\circ\text{C}$) terjed és a megfelelő csúcsalak eléréséhez a mozgófázis előfűtése, valamint az oszlop után a detektor hőmérsékletére történő hűtése szabályozott. Ennél szélesebb hőmérséklet-tartományban alkalmazható a Shimadzu gyártó Nexera® készüléke, amely 150°C-ig képes a hőmérséklet pontos ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) értéken tartására. A legszélesebb hőmérséklet-tartományt továbbra is a Polaratherm Series 9000 készülék biztosítja, amely szobahőmérséklet mínusz 5°C-tól, (hűtőfej alkalmazásával akár -20°C -tól is) használható 200°C hőmérsékletig (pontosság $\pm 0,5^\circ\text{C}$).

Az emelt hőmérséklet alkalmazása során szükséges az oszlop utáni hűtés UV detektornál, mert így elkerülhető az alapvonal zaj és hosszabb az átfolyó cella élettartama. Korábbi években víz- vagy jégfürdőbe merített kapillárisal oldották meg a hűtést, de így a hőmérséklet pontos értéken tartása és reprodukálhatósága nehézkes volt a rutin analitikában. Napjainkban már Peltier hűtést alkalmaznak. Nem szükséges a mozgófázis lehűtése az oszlop után például tömegspektrometriás vagy fényszórásos detektor alkalmazásakor.

3.1.3. Oszlop

Azt mondhatjuk, hogy a kromatográfia szíve az oszlop. Az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia alkalmazásához termikusan és kémiaiilag is stabil oszlopot, állófázist kell választani. Az új generációjú állófázisok között egyre több alkalmazható széles hőmérséklet-tartományban. A legtöbb, fordított fázisú folyadékkromatográfiás elválasztás során használt, módosított szilikagél alapú állófázis maximálisan 80°C-on alkalmazható, felette már csökken az oszlop élettartama a szilanol csoportok hidrolízise miatt. A szilikagél alapú állófázisoknál is van lehetőség a termikus stabilitás növelésére: (1) szerves védőréteget alakítanak ki a szilikagél felületén, (2) a szilikagél felületét kémiaiilag kötik, vagy módosítják „endcapping” technológiával, (3) szintetikus úton hibrid részecskéket építenek be a szilikagél mátrixba [33-34]. Felületileg kezelt porózus szilikagél állófázist alkalmaztak peptidek, fehérjék és nukleinsavak elválasztására 80°C körüli hőmérsékleten [35]. Sztérikusan védett Zorbax C₈ és C₁₈ oszlopon peptideket és fehérjéket választottak el szerves-vizes mozgófázisban emelt hőmérsékleten [36-38]. Horváth Csaba és munkatársai pellikuláris

szilikagél alapú állófázison, 120°C felett vizsgáltak különböző fehérjéket [39,40]. Fontos tudni, hogy a szilikagél alapú állófázisok élettartamát lúgos foszfát pufferek alkalmazása is megrövidítheti emelt hőmérsékleten [41]. A módosított szilikagél alapú állófázisok jobb termikus stabilitására mutatnak példát Marin és munkatársai [42].

Míg a szilikagél alapú állófázisok kémiai és a termikus stabilitása behatárolt, addig az egyéb polimer alapú, grafitizált szén alapú és az ultra stabil fém-oxid alapú állófázisok, mint a titán-dioxid, alumínium-oxid és a cirkónium-dioxid alapú állófázisok jó hőstabilitással rendelkeznek. Ezeknek az oxidoknak már korábban is vizsgálták a felületi és a kémiai tulajdonságait [43,44]. Bár az oxidok termikusan ugyan stabilak, de a titán- és alumínium-oxid alapú állófázisok alkalmazására csak néhány publikációt találunk. A titán-dioxid nem áll rendelkezésre olyan tisztaságban, amely szükséges lenne a kromatográfiás oszlop készítéséhez, az alumínium-oxid a savas pH tartományban oldódik. A cirkónium-dioxid alapú állófázisok felhasználására számos példát találunk az irodalomban, mivel nagyon jó a termikus stabilitásuk (200–250°C) [10,45-49]. A legszélesebb körben elterjedt cirkónium-dioxid alapú állófázis a ZirChrom-PBD, vagyis a polibutadiénnel módosított, amit 200°C feletti hőmérsékleten is jó reprodukálhatósággal lehet használni [50]. Egyéb cirkónium-dioxid alapú állófázisok (úgy mint polisztirol-, szén-, foszfát-módosított) is ismertek az irodalomból, melyek szintén nagyon jó termikus stabilitást mutatnak. A polimer alapú állófázisok (pl. polisztirol-divinil-benzol) 150°C hőmérsékletig használhatók a ko-polimerizációnak köszönhetően. A grafitizált szén alapú állófázisok porózus grafit kristályok, amelyek ezáltal különösen jó pH- és hőstabilitással rendelkeznek [51].

Napjainkig az oszlopok hosszú távú termikus stabilitásáról nincsenek megfelelő adatok, mivel nincs olyan általános teszt, amellyel jól összehasonlíthatók. Több tanulmány is született, amelyek különböző oszlopok stabilitásáról számolnak be [52-55]. Meg kell jegyezni, hogy jó termikus stabilitás adott körülményekben nem garantálja ugyanazt a hosszú élettartamot más kísérleti körülmények között. Bár a cirkónium-dioxid alapú állófázisok rutinszerűen használhatók izoterm körülmények között emelt hőmérsékleten, programozott hőmérsékletű folyadékkromatográfiás elválasztásoknál nem mutatnak kellő stabilitást, ellentétben a grafitizált szén és a speciális szilikagél alapú állófázisokkal [54].

3.1.4. Az irodalomban vizsgált vegyületek áttekintése

Az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfiás vizsgálatokat a kutatásokban vegyületek széles körére alkalmazzák – például alkil-fenolok és etoxilátjaik [56], alkil-benzol-származékok [57], triazol vegyületek [58,59] és szteroidok [28,60,61] vizsgálatára –, míg a rutin analitikában kevésbé elterjedt technika. A HTLC alkalmas minden olyan vegyület analízisére, amelyek a hőmérséklet-emelés hatására nem szenvednek hőbomlást. A technika alkalmazásának határt szab az oszlopon lejátszódó reakció is, mely függ a vizsgálandó minta oszlopon töltött idejétől, valamint a közegtől. A reakciósebesség nő abban az esetben, ha katalitikusan aktív helyek is találhatók az oszlopon [62], ill. az állófázis típusa is befolyásolhatja a vizsgálandó anyag stabilitását [63]. Horváth Csaba és munkatársai megállapították, hogy a reakciósebesség emelt hőmérsékleten jelentéktelen abban az esetben, ha a komponensek oszlopon történő tartózkodását lecsökkentették, amit az áramlási sebesség növelésével értek el [2]. Az oszlop hosszának csökkentése előnyt jelent az oszlopon lejátszódó zavaró mellékreakciók visszaszorításában is [64]. Ebben az esetben is előfordulhat gyors bomlási reakció, ami a kvantitatív analízis eredményét bizonytalanná teszi. Ennek kiküszöbölésére kalibrációt kell végezni az adott komponensre, vagy a bomlástermékeire [65].

Az anyagátadási entalpia nagy molekuláknál jóval nagyobb, mint kis molekuláknál, ami azt jelenti, hogy a hőmérséklet hatása a peptidekre, fehérjékre jóval hangsúlyozottabb. A kutatásban nagy előszeretettel használják az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfiát fehérjék, vagy esetenként a bomlástermékeik vizsgálatára, a bomlási utak felderítésére [39,40,66].

3.2. A ciklodextrinek

3.2.1. A ciklodextrinek története és alkalmazásai

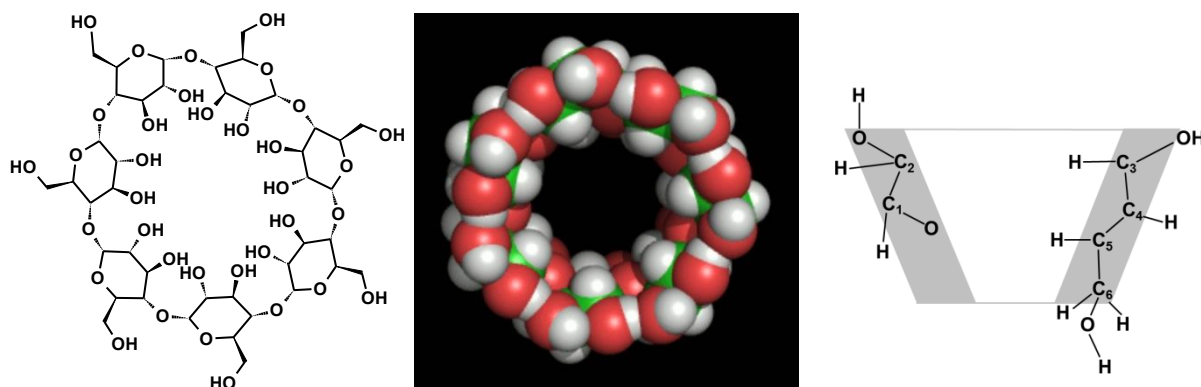
De Villers francia kutató 1891-ben megfigyelte, hogy a burgonya rothadásakor kristályos anyag képződik; majd 1904-ben Franz Schardinger bécsi mikrobiológus élelmiszerromlást okozó mikrobákat vizsgálva a rothadó burgonyából egy mikroorganizmust különített el, amelyet *Bacillus macerans*-nak nevezett. Ennek hatására a burgonyából kétféle kristályos anyag keletkezett, amelyeket dextrineknek neveztek el. A ciklodextrinek szerkezetét az 1930-as években Fraudinger és munkatársai derítették fel a Heidelbergi Egyetemen [67].

A ciklodextrinekkel több mint egy évtizeddel később a világ két egymástól távoli pontján – az Iowai Egyetemen és Heidelbergben – kezdtek foglalkozni. Ekkor kerültek kidolgozásra a ciklodextrinek előállításának és tisztításának lehetőségei és felderítették fizikai-kémiai tulajdonságaikat. D. French professzor az 1950-es évek elején a ciklodextrinek tulajdonságait összefoglaló cikkében leírta, hogy a ciklodextrinekkel etetett kísérleti patkányok elpusztultak, tehát a vegyület toxikus [68]. Ez az információ 20 évre leállította a ciklodextrinek alkalmazásának kutatását.

Az 1970-es években Magyarországon és Japánban egymástól függetlenül intenzív kutatás indult a ciklodextrinek ipari alkalmazási lehetőségeinek feltárására. Időközben a ciklodextrin kutatás és irodalom robbanásszerűen növekedett. A ciklodextrineket és kémiai vagy enzimmel módosított származékaikat manapság a biotechnológia, a vegyipar és az élelmiszeripar számos területén alkalmazzák: az élelmiszeriparban, gyógyszeriparban, növényvédőszer iparban és kozmetikai iparban stabilizálásra, szagtalanításra, oldhatóság növelésre, formulázásra, valamint a kellemetlen ízek és irritáló hatások csökkentésére. Királis elválasztástechnikai felhasználásukra a 3.2.5. fejezetben térek ki.

3.2.2. A ciklodextrinek tulajdonságai

A ciklodextrinek kémiai szempontból D-glükopiranoz egységekből álló α -(1-4) glikozidos kötésekkel felépülő ciklikus, nem redukáló oligoszacharidok. A glükopiranoz egységek száma szerint α - (6), β - (7) és γ -ciklodextrinet (8 egység) különböztetünk meg. Az α -CD-nél kisebb gyűrű szterikus okok miatt nem jöhet létre, a γ -CD-nél nagyobb gyűrűknek az alkalmazások szempontjából nincs jelentőségük. A ciklodextrinek csonka kúp alakú molekulák, melynek CH csoportokból és glikozidos oxigén híd atomokból álló ürege hidrofób sajátosságú, pereme az ott elhelyezkedő OH-csoportoknak köszönhetően hidrofíl jellegű. A szélesebb nyílásnál a 2 és 3 helyzetű szekunder hidroxilcsoportok találhatók, a keskenyebb nyílásnál a primer 6-OH (4. ábra).



4. ábra Natív β -ciklodextrin szerkezeti képlete, kalottmodellje és CH/CH₂ protonjainak sematikus térbeli elhelyezkedése (grafika: Szakács Zoltán)

1. táblázat Az α -, β - és γ -ciklodextrinek főbb jellemzői [69,70]

	α -CD	β -CD	γ -CD
M (g/mol)	972	1135	1297
Üreg átmérője (Å)	4,7 – 6 (0,57 nm)	~8 (0,78 nm)	~10 (0,95 nm)
Perem átmérő (nm)	1,46 \pm 0,4	1,54 \pm 0,4	1,75 \pm 0,4
Üreg magasság (nm)	0,79 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1
Üreg térfogat (nm ³)	0,174	0,262	0,427
Víztartalom	10 – 12,2% 6 – 7,5 H ₂ O/CD	13,2 – 14,5% 11 – 12 H ₂ O/CD	8,1 – 17,7% 13 – 17 H ₂ O/CD
Vízoldhatóság (25°C-on)	14,5 g/100 cm ³	1,85 g/100 cm ³	23,2 g/100 cm ³

A ciklodextrinek néhány szerkezeti jellemzőjét az 1. táblázatban foglaltam össze. Az α -CD \cdot 6H₂O szerkezetben csak 2 vízmolekula van ténylegesen az üregben, 4 molekula kívül foglal helyet [71]. A β -CD molekulánál a 25°C-on kialakuló hidrát 11 vízmolekulából áll és ezek 16 különböző helyzetűek lehetnek: 8 a ciklodextrin molekula üregében és 8 kívül. A hidegen gyenge oldhatóságú β -CD meleg vízben jobban kapcsolódik a hidrogénkötésű vízszerkezetbe, így a hőmérséklettel nő a vízoldhatósága [72]. A γ -CD üregében 14 elfoglalható hely van, amiből 6,5 és 7,1 közötti hely foglalt, a többi vízmolekula kívül helyezkedik el [73].

Az eddig tárgyalt natív ciklodextrinek alkoholos hidroxilcsoportjainak kovalens módosításával (összesen 18, 21 ill. 24 szabad OH csoport az α -, a β - ill. a γ -CD esetén) számtalan szubsztituált származék előállítható, változatos (részben tervezhetően módosítható) oldhatósági és komplexképzési tulajdonságokkal. A CD-származékok átlagos szubsztitúciós fokán (*DS*) azt értjük, hogy molekulánként átlagosan hány hidroxilcsoporton történt szubsztitúció. Az irodalomban már közel ezerféle szubsztituált ciklodextrin származékot írtak le. Többféleképpen csoportosíthatók: a szubsztituensek típusa, száma, elhelyezkedése és azok ionizálhatósága alapján. A szubsztitúciós fok alapján megkülönböztetünk monofunkciós (*DS* = 1) vagy többfunkciós CD-ket. Utóbbiak lehetnek egységes, izomertiszta anyagok (mindegyik CD molekula szubsztitúciós mintázata ugyanaz), gyakoribbak azonban a random szubsztitúcióval előállított termékek, amelyek különböző szubsztitúciófokú, ezeken belül a funkcionális helyében is különböző regioizomerek komplex keverékei (itt a *DS* gyakran törtszám). Az izomertiszta CD-k (például a permetilezett- β -CD) nagy jelentőségűek az elválasztástechnikai gyakorlatban és egyensúlyi, valamint a szerkezeti vizsgálatokban is egyértelműbb eredményeket adnak (l. a 3.2.3.6. fejezetben). A random szubsztituált ciklodextrinek szintén igen hatékony elválasztásokat tehetnek lehetővé, azonban számítanunk kell a gyártási tételenkénti változékonyságra a módszerfejlesztés és -validálás során, hiszen a véletlen szubsztitúció ritkán eredményezi pontosan ugyanazt a CD-származék-elegyet. Ionizálható szubsztituens bevitelével állandó vagy pH-függő töltéssel láthatjuk el a ciklodextrint, jelentősen javítva az oldhatóságot. Iparilag elsősorban a β -CD származékait állítják elő, egyrészt a kedvező ára miatt, valamint a β -CD üregének a mérete a legmegfelelőbb a hatóanyagok többsége számára. A szubsztituált ciklodextrinek közül a leggyakoribbak az alkil- (metil-, etil-, propil-, hidroxialkil-) származékok. Ismertek az acetyl-ciklodextrin származékok, a nitrogén tartalmú (pl. amino- és alkilamino-) ciklodextrinek, de kén tartalmú származékokat is előállítottak [68].

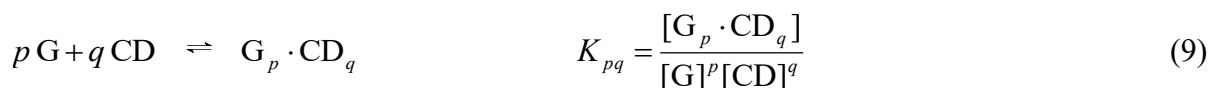
Ezen kívül leírtak olyan vegyületeket is, amelyek molekulánként több ciklodextrin gyűrűt tartalmaznak, ezeket ciklodextrin polimereknek nevezzük [74]. A kapilláris elektroforetikus elválasztásokban számos más (például permanens töltéssel rendelkező) funkciós csoporttal szubsztituált ciklodextrin-származékot is használnak. Mivel doktori munkám során nem került sor az alkalmazásukra, ezért ezeket nem részletezem.

3.2.3. A ciklodextrin-komplexek

Egy CD kismolekulával való asszociációja során leggyakrabban *zárványkomplex* képződik: a vendégmolekula egésze vagy hidrofób molekularésze az oldatfázisból a CD gazdamolekula apoláris üregébe jut a szélesebb vagy (ritkábban) a keskenyebb nyíláson keresztül. A folyamat fizikai-kémiai paraméterekkel történő jellemzése elméleti és gyakorlati (analitikai vagy gyógyszerformulálási) szempontból egyaránt fontos.

3.2.3.1. A komplexképződés egyensúlyi leírása

A G vendégmolekula és a CD egyensúlyi reakciójában keletkező szupramolekuláris komplex kialakulását az alábbi egyensúlyi reakció írja le általánosan,



ahol p és q az összetevők sztöchiometriai indexei [75]. A K stabilitási (képződési, kötődési, asszociációs) állandó kifejezését termodinamikailag aktivitásokkal kellene felírni, de a komplexkémiai gyakorlatban szinte kizárólag egyensúlyi koncentrációkkal definiált, látszólagos állandókat használnak, melyek adott körülmények (oldószer(elegy), pH, ionerősség, hőmérséklet) között érvényesek.

A komponensek analitikai (totál) koncentrációja és az oldatban jelenlevő részecskefajták egyensúlyi koncentrációi között az anyagmérleg-egyenletek teremtenek kapcsolatot, például:

$$c_G = [\text{G}] + [\text{G} \cdot \text{CD}] + [\text{G} \cdot \text{CD}_2] + 2[\text{G}_2 \cdot \text{CD}] + \dots = [\text{G}] \{1 + [\text{CD}](K_{11} + K_{12}[\text{CD}] + 2K_{21}[\text{G}] + \dots)\} \quad (10)$$

$$c_{\text{CD}} = [\text{CD}] + [\text{G} \cdot \text{CD}] + 2[\text{G} \cdot \text{CD}_2] + [\text{G}_2 \cdot \text{CD}] + \dots = [\text{CD}] \{1 + [\text{G}](K_{11} + 2K_{12}[\text{CD}] + K_{21}[\text{G}] + \dots)\} \quad (11)$$

A komplexstabilitás kvantitatív vizsgálatára mindazon módszerek alkalmasak, melyekben a komplexképződés foka egyértelmű kapcsolatba hozható a mért fizikai-kémiai paraméter változásával (spektrometriás titrálásoknál) vagy koncentrációváltozással potenciometriás titrálás vagy fázis-oldhatósági vizsgálat [76] során. Stabilitási állandók számítása csak egyensúlyi modell ismeretében, vagy annak feltételezésével lehetséges, ezért a sztöchiometria vizsgálatával kezdjük a kísérleti módszerek áttekintését.

3.2.3.2. A képződő komplexek sztöchiometriai vizsgálata

A ciklodextrin és a "kismolekula" reakciójakor oldatfázisban leggyakrabban 1:1 molarányú zárványkomplex alakul ki, de ismertek $G \cdot CD_2$ [75,77] és $G_2 \cdot CD$ [67] összetételű komplexek is. A koncentrációviszonyoktól függően akár többféle komplex egyidejű jelenlétével is számolni kell az egyensúlyi elegyben. A komplexek közvetlen "megfigyelése" tömeg/töltés arányuk mérésén keresztül a kíméletes ionizációt megvalósító electrospray tömegspektrometriával (ESI-MS) lehetséges [78,79]. ESI-MS alkalmazásakor a különböző összetételű CD-komplexek disszociáció nélkül kerülhetnek az oldatfázisból a nagyvákuumba, ahol tömeg/töltés arányuk alapján közvetlenül detektálhatók (pl. [80]). Fontos független módszerrel megbizonyosodni arról, hogy a gázfázisban detektált komplex valóban jelen volt az oldatban és nem a deszolváció során keletkezett a tömegspektrométerben. Potenciometriás vagy spektroszkópiás titrálás, fázis-oldhatósági vizsgálat kiértékelésekor indirekt bizonyítékot kapunk a feltételezett sztöchiometria helyességére. A továbbiakban csak a munkánk során is használt mágneses magrezonancia spektroszkópiás, NMR (alapjait lásd pl. [81]) módszerekkel foglalkozunk.

Egy NMR-aktív mag (például 1H vagy ^{13}C) mért kémiai eltolódását a következő egyenlet írja le:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{\text{ref}}}{\nu_0} \quad (12)$$

ahol ν a kiválasztott magnak, ν_{ref} egy referenciaanyag ugyanolyan nuklidjának a rezonanciafrekvenciája [Hz], ν_0 a spektrométer mérési alapfrekvenciája [MHz]. A komplexképződés hatásainak tárgyalásához jelölje δ_G^i a vendégmolekula i . magjának kémiai eltolódását ciklodextrin távollétében. Ha CD hozzáadására komplex képződik, megváltozik az i . mag kémiai környezete és a lokális elektronsűrűség, spektrumjele tehát (többé-kevésbé)

eltolódik. A megváltozott $\delta^{G,i}$ kémiai eltolódás két "határérték": δ_G^i és az 1:1 komplexre jellemző $\delta_{G\cdot CD}^i$ móltörttekkel súlyozott átlaga:

$$\delta^{G,i} = x_G \delta_G^i + x_{G\cdot CD} \delta_{G\cdot CD}^i \quad (13)$$

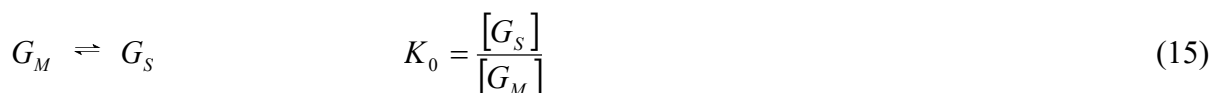
A kémiai eltolódás megváltozását $\Delta\delta^{G,i} = \delta^{G,i} - \delta_G^i$ komplexképződési eltolódásnak nevezhetjük (angolul *complexation-induced chemical shift* vagy *chemical shift displacement* [82-84]), határértéke $\Delta\delta_{\infty}^{G,i} = \delta_{G\cdot CD}^i - \delta_G^i$ (*limiting chemical shift displacement*) a teljes (100%) komplexképződésnek megfelelő multipllett-eltolódást számszerűsíti. A kémiai eltolódások (13) egyenlet szerinti átlagolódása akkor következik be, ha a komplexképződés, mint pszeudo-elsőrendű reakció pillanatszerűen gyors a "kémiai eltolódás időskálán" (*fast-exchange regime*) $k \gg \Delta\delta_{\infty}^{G,i} \cdot \nu_0$ [85]. 1:1-től eltérő sztöchiometriájú részecskefajták fellépésekor a (13) egyenlet további tagokkal bővül. Analóg definíciók (δ_{CD}^j , $\delta_{G\cdot CD}^j$, $\Delta\delta^{CD,j}$, $\Delta\delta_{\infty}^{G,j}$) vezethetők be a CD spinjeinek spektrumjel-eltolódásának leírására is.

Az NMR titrálásokat többféle kísérletterv szerint végezhetjük [85,86]. Sztöchiometria vizsgálatára előszeretettel alkalmazzák Job módszerét (*method of continuous variations*) [87], melynek alapja a mérhető $\Delta\delta^{G,i}$ változó és a komplex koncentrációja (móltörtje) közti egyenes arányosság (levezethető az (13) egyenletből). Olyan oldatsorozatot készítünk, amelyben a vendég- és gazdamolekulák analitikai koncentrációjának összege ($c_{CD} + c_G$) állandó, csak a móltörtjük változik kis lépésekben 0 és 1 között. Az $x_G \cdot \Delta\delta^{G,i}$ értékeket x_G függvényében ábrázolva szélsőértéket kapunk a $G_p \cdot CD_q$ komplexnek megfelelő $x_G = p/(p + q)$ abszcisszánál. Több komplex együttes képződésekor a módszer csak a legnagyobb koncentrációban jelen levő(k)re adja meg az átlagos összetételt és a szélsőérték helyzetének bizonytalansága is nagyobb [88].

Az NMR spektroszkópia egyik előnye, hogy a Job analízist a vendégmolekula többi megfigyelt (akár mindegyik) szénkötésű protonjára is elvégezhetjük, így több független adatsorral erősíthetjük meg a komplex(ek) sztöchiometriáját. További előny, hogy a másik reakciópartner oldaláról is vizsgálhatjuk a komplexképződést, ekkor az $x_{CD} \cdot \Delta\delta^{CD,i}$ szorzatokat ábrázoljuk x_{CD} függvényében és a szélsőérték abszcisszája a CD-re vonatkozó átlagos összetételt mutatja.

3.2.3.3. A stabilitási állandók meghatározása elválasztástechnikai módszerekkel

Komplexstabilitás vizsgálatára alkalmas módszerek többek között a potenciometriás titrálás [78], az UV-látható spektrofotometria [76,89], a fluoreszcencia [90], a konduktometria [91] vagy a tömegspektrometria [92], de elválasztástechnikai módszerekkel is jellemezhető. Fordított fázisú kromatográfiában a ciklodextrint növekvő koncentrációban a mozgófázishoz adva, a hidrofób sajátságú molekulák állófázison történő visszatartása csökken a CD-mentes kísérlethez képest. A hidrofil felületű CD-k és a szénhidrogén láncokkal borított állófázis között gyengébb kölcsönhatás figyelhető meg, mint egy hidrofób molekula és az állófázis között [93]. Fujimura és munkatársai feltételezték [94], hogy amennyiben a vizsgált molekula CD komplexe ($G \cdot CD$) zárványkomplex jellegű, akkor nem csak az állófázis – CD, hanem a komplex – állófázis közötti kölcsönhatás is elhanyagolható a vendégmolekula – állófázis kölcsönhatása mellett. Ebből következik, hogy a vendégmolekula (G) lényegében komplexátlatlan formában kötődik az állófázishoz és mind szabad (G), mind komplexált ($G \cdot CD$) formában van jelen a mozgófázisban. Az álló- (S) és a mozgófázis (M) között lejátszódó folyamatok a következő reakciókkal és egyensúlyi állandókkal jellemezhetők:



A komplexált molekula visszatartási tényezője a fázisarány és a megoszlási hányados szorzataként írható fel:

$$k = \Phi K^G \quad (18)$$

ahol a megoszlási hányados az álló- és a mozgófázisra jellemző totálkoncentrációk aránya:

$$K^G = \frac{c_s^G}{c_M^G} \quad (19)$$

A visszatartási tényező tehát:

$$k^G = \Phi \frac{[G_s] + [GCD_s]}{[G_M] + [GCD_M]} \quad (20)$$

Az előzőekben leírt elhanyagolásokat figyelembe véve adódik:

$$k^G = \Phi \frac{K_0}{1 + K_a^G [CD_M]} \quad (21)$$

Szabadállapotú (nem komplexált) molekula visszatartási tényezője:

$$k = \Phi K_0 \quad (22)$$

Az előző egyenleteket kombinálva, a vendégmolekula visszatartási tényezője számítható a mozgófázis CD-koncentráció függvényében.

$$k^G = \frac{k}{1 + K_a^G [CD_M]} \quad (23)$$

A visszatartási tényező felhasználásával:

$$k^G = \frac{t_{obs}^G - t_0}{t_0} \quad (24)$$

$$k = \frac{t_R^G - t_0}{t_0}$$

a Benesi-Hildebrand egyenlet átrendezett alakjához jutunk:

$$\frac{1}{t_{obs}^G - t_0} = \frac{1}{t_R^G - t_0} + \frac{K_a^G [CD_M]}{t_R^G - t_0} \quad (25)$$

A (25) egyenletet átrendezve számítható az egyensúlyi állandó folyadékkromatográfiás paraméterek segítségével is:

$$K_a^G = \frac{1}{[CD_M]} \frac{t_R^G - t_{obs}^G}{t_{obs}^G - t_0} \quad (26)$$

ahol G a vizsgált komponens, t_0 a visszatartás nélkül eluálódó oldószer retenciós ideje, t_R^G a vizsgált molekula CD mentes közegben mért retenciós ideje, míg t_{obs}^G a CD jelenlétében mért retenciós idő. A fenti összefüggések gyors kinetikájú, 1:1 komplexképzés speciális esetére vonatkoznak.

3.2.3.4. A stabilitási állandók meghatározása NMR titrálással

Komplexstabilitás vizsgálatára alkalmas módszerek közül a legsokoldalúbban alkalmazható az NMR-spektroszkópia [85,95,96], hiszen a vendégmolekula spinjeinek kémiai eltolódásán túl relaxációs tulajdonságaik vagy a diffúziós együttható CD hatására történő megváltozása is követhető a modern NMR pulzusprogramok segítségével. Az esetek döntő többségében mégis a kémiai eltolódás változásából történik a stabilitási állandók kiszámítása, ez ugyanis a legegyszerűbben és legpontosabban mérhető spektrumparaméter, bizonytalansága a nagyterű (> 400 MHz) szupravezető mágneseken $\pm 0,005$ ppm [85] vagy még ennél is kisebb (lásd saját tapasztalatainkat a 6.2.2.1. fejezetben). A növekvő térerővel együtt járó érzékenységnövekedés, amely hűtött elektronikájú mérőfejjel (*cryoprobe*) még tovább fokozható, nemcsak az ^1H NMR titrálások gyorsabb vagy éppen kisebb koncentrációnál való kivitelezését teszi lehetővé, hanem akár ^{13}C kémiai eltolódások bevonását is a titrálásba [76].

Az NMR titrálás során gyakran a vendégmolekula koncentrációját tartjuk állandó értéken (pl. esetleges aggregációjának elkerülésére) és fokozatosan növeljük a CD koncentrációját (mólarányát) egészen a CD oldhatósága vagy az NMR dinamikus tartománya szabta határig (utóbbi a vendégmolekula jeleinek detektálhatósága a megnövekedett CD-jelek mellett). Minden titrálási pontban regisztráljuk a vendégmolekula szénkötésű protonjainak $\delta^{G,i}$ kémiai eltolódását, illetve annak $\Delta\delta^{G,i}$ megváltozását. Az így kapott $\Delta\delta^{G,i}$ vs. c_{CD} adatsorok (titrálási görbék) mindegyike a következő modellfüggvénnyel illeszthető, ha kizárólag 1:1 komplex képződik:

$$\Delta\delta^{G,i} = \delta^{G,i} - \delta_G^i = \frac{\Delta\delta_\infty^{G,i} K[CD]}{1 + K[CD]} \quad (27)$$

A CD nagy feleslege esetén alkalmazhatjuk a $[CD] \cong c_{CD}$ közelítést, általános esetben $[CD]$ a (10) és (11) anyagmérleg-egyenletek megoldásával nyerhető. Az 1:1 komplexképzés speciális esetére $[CD]$ analitikusan is kifejezhető az összkoncentrációkkal [84], de számításához szükség van a K stabilitási állandóra (vagy az iterációk kezdetén legalább a becslésére) is:

$$\Delta\delta^{G,i} = \delta^{G,i} - \delta_G^i = \frac{\Delta\delta_\infty^{G,i} \left\{ c_G + c_{CD} + K^{-1} - \sqrt{(c_G + c_{CD} + K^{-1})^2 - 4c_G c_{CD}} \right\}}{2c_G} \quad (28)$$

$\Delta\delta_\infty^{G,i}$ értéke elvileg leolvasható a telítési görbe "platójaként", de az ennek eléréséhez szükséges nagy CD-koncentrációkig a gyakorlatban általában nem tudunk eljutni. A K állandó és a $\Delta\delta_\infty^{G,i}$ határeltolódás legpontosabban nemlineáris paraméterbecsléssel határozható meg a titrálási görbéből [85]. A különböző i magok titrálási görbéiből kapott egyensúlyi állandók gyakran kismértékben eltérnek (jelentős eltérésük megkérdőjelezheti a feltételezett 1:1 sztöchiometria helyességét [95]), a titrálási görbék szimultán regressziójával robosztusabb és kisebb szórású állandót kapunk. Az 1:1 és az 1:2 komplexek stabilitási állandóinak együttes meghatározása csak több mag adatsorának szimultán illesztésével lehetséges ("globális analízis" [76]) és további matematikai-statisztikai problémákat is felvet [97-99]. A (27) egyenlet különböző linearizálásai csak megfelelő súlyozással adnak K -ra torzítatlan eredményt [85], viszont a transzformált pontok egy egyenesre esése az 1:1 sztöchiometria érvényességének indikátora lehet [80]. Általában 10 és 10^4 közé eső stabilitási állandót lehet NMR titrálással meghatározni és a maximális pontosság elérésére célszerű olyan CD koncentrációtartományt választani, hogy a komplex móltörtje $0,2$ és $0,8$ közé essen [85]. A fentiekkel analóg módon a CD, illetve mindkét reakciópartner kémiai eltolódásainak változásából is találunk példát egyensúlyi állandó(k) számítására [76].

3.2.3.5. A komplexképződés termodinamikája

A ciklodextrin-komplexek stabilitásának fontos feltétele a sztérikus faktor, azaz hogy a molekula (vagy annak egy csoportja) jól illeszkedjen a CD üregébe. Köztudott például, hogy a hosszú alkilláncok az α -CD-vel, míg a benzol- vagy adamantilszármazékok inkább a β -CD-

vel képeznek stabilabb komplexet a natív ciklodextrinek közül [100]. A vendégmolekula alak és méret szerinti megfelelése nem az egyetlen lényeges tényező. A komplex stabilitását még a következő tényezők finom összjátéka befolyásolhatja: a van der Waals vonzás, a hidrofób effektus, a dipól- (indukált) dipól kölcsönhatás, az aromás gyűrűk π - π diszperziós kölcsönhatása, a hidrogénkötés, töltött csoportok esetén az elektrosztatikus vonzás/taszítás is, valamint a CD konformációváltozásának járuléka, pl. a gyűrűfeszülésének csökkenése [75,100]. Tabushi szerint a komplex képződésének fontos mozzanatai a vendégmolekula és a CD üregének deszolvatációja, a vendégmolekula (hidrofób molekularészletének) az üregbe illeszkedése és az oldószer-molekulák újrendeződése a képződött komplex körül [101].

A komplexképződés termodinamikai leírása a hidratált vendég- és gazdamolekulák, valamint a képződő (hidratált) komplex közti standard szabadentalpia-különbségen alapul:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (29)$$

A stabilitás említett komponensei különböző mértékben járulnak hozzá a ΔH° entalpiikus vagy a ΔS° entrópikus taghoz, egyes tagok járulékát kvantumkémiai módszerekkel becsülni lehet [102,103]. A komplexstabilitás háttérében álló lényeges faktorok felderítésére az egy hőfokon meghatározott ΔG° vagy K érték csak korlátozottan alkalmas, mert a ΔH° és $T\Delta S^\circ$ tagok kiolthatják egymást, ami miatt az egyensúlyi állandók a vendégmolekula szerkezetével csak csekély változékonyságot mutatnak [100,104]. Az ún. entalpia-entrópia kompenzáció gyakori szupramolekuláris rendszerek esetén, bár elméleti alapjairól és biztos azonosításáról is megoszlanak a vélemények [100,103,104].

A termokémiai mennyiségeket legpontosabban (mikro)kalorimetriával lehet meghatározni [105], de az egyensúlyi állandók hőmérséklet függéséből, a van't Hoff egyenlet:

$$\ln K = \Delta S^\circ/R - (\Delta H^\circ/R) 1/T \quad (30)$$

meredekségéből és tengelymetszetéből is számíthatunk entalpia- és entrópiaváltozást, ha ezek függetlenek a hőmérséklettől a vizsgált tartományon belül. Például Sadlej-Sosnowska ösztradiol-származékok CD-komplexeinek stabilitását HPLC módszerrel vizsgálta víz/szerves oldószerkelegyekben [106]. A stabilitási állandók hőmérséklet függéséből kapott ΔH° értékek metanol-víz 45:55 elegyre negatívabbak voltak az acetonitril-víz 30:70 elegyre mérteknél, amiben a szerző szerint a CD üreg különböző mértékű deszolvatációjának van döntő szerepe.

A γ -CD-vel egyébként mindegyik szteroid nagyobb stabilitású komplexet adott, mint β -CD-vel, amint az az üregméretek alapján várható is volt.

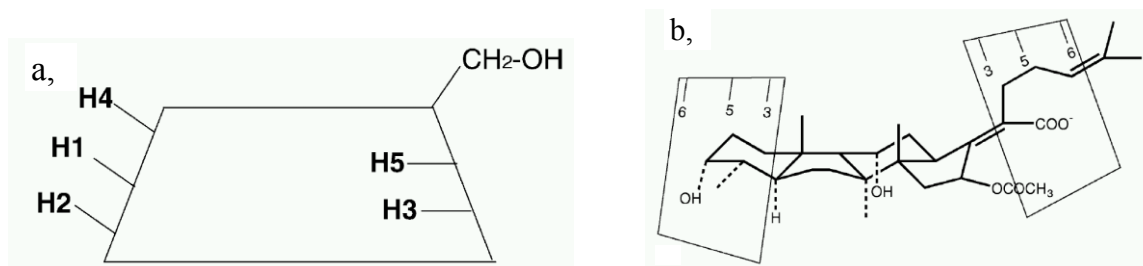
3.2.3.6. A CD-komplexek szerkezeti jellemzése

Ciklodextrin-komplexek atomi felbontású szerkezetét szilárd fázisban egykristály-röntgendiffrakcióval [96], oldatfázisban NMR spektroszkópiával lehet jellemezni [95,96], de a molekulamodellezés (kvantumkémiai módszerek) alkalmazása is egyre gyakoribb [98,107].

^1H NMR esetén a szerkezeti információ legegyszerűbb forrását a reakciópartnerek különböző konstitúciós helyzetű protonjainak $\Delta\delta$ komplexképződési eltolódásai (vagy $\Delta\delta_\infty$ határeltolódásai) jelentik. Például a natív ciklodextrinokban H3 és H5 az apoláris üregben, a többi metinproton viszont a kónusz külső felén helyezkedik el (5.a. ábra). H3 és H5 jelentős kémiai eltolódás csökkenése bizonyítja a vendégmolekula π -elektronokban dús részletének az üregbe kerülését, tehát inklúziós komplex kialakulását [95,108]. Hasonlóan, ha a vendégmolekula egyes protonjain a többinél nagyobb (abszolút értékű) $\Delta\delta$ mérhető, ez az érintett molekularészlet jelentősebb szerepére utal a komplexképzésben [93]. Bár számos szerző ebből a molekularészlet CD üregébe illeszkedésére is következtet [98,109], óvatosan kell eljárni az interpretáció során, hiszen a kémiai eltolódás közvetett okokból is, például a vendégmolekula térszerkezet-változása miatt is jelentősen változhat.

A $\Delta\delta$ értékkel szemben jóval biztosabb szerkezeti következtetések vonhatók le az ún. nagy Overhauser hatás (NOE) mérésével [110], amelyből protonok térközelségére nyerhetünk (kalibrálás után akár kvantitatív) információt. Ekkor egy kiválasztott proton populációjának (technikailag: spektrumjelének) változtatása a hozzá térben közeli protonok jelen is intenzitásváltozást okoz dipoláris keresztrelaxáció útján. Az effektus rövid hatótávolságú ($< 5 \text{ \AA}$) és a protonok távolságának hatodik hatványával fordítottan arányos. *Intramolekuláris* NOE a CD spinjei között külön a CD (komplexbeli) geometriájáról, a vendégmolekula protonjai között pedig külön utóbbinak a (komplexbeli) térszerkezetéről hordoz információt. Igazán értékesek az *intermolekuláris* NOE keresztcsúcsok, amelyek térközelségeket, mint (fél)kvantitatív kényszerfeltételeket rögzítenek a CD és vendégmolekula egyes protonjai között, lehetővé téve részletes geometriai modell megalkotását. A CD H3 és H5 protonjainak dipoláris keresztcsúcsaival például azonosíthatjuk, a vendégmolekula mely molekularészlete, milyen „mélyen” és melyik irányból került a CD üregébe (lásd pl. 5.b. ábra).

A NOE mérésére szolgáló számos pulzusprogram [110] közti döntést befolyásolja a szupramolekuláris komplex „forgásának” (*rotational tumbling*) korrelációs ideje, τ_c . 500-600 MHz-es protonfrekvenciájú (ω_0) készüléken pozitív NOE-t (gyors mozgás, $\omega_0 \tau_c \gg 1$) kb. 1 kDa alatti, negatívát ($\omega_0 \tau_c \ll 1$) pedig csak jóval 5 kDa fölötti móltömegű vegyületekre várhatunk. Mivel az 1:1 CD-komplexek tipikus móltömege az átmeneti tartományba esik, itt a NOE előjelet vált, ezért az 1D vagy 2D NOESY spektrumok alig tartalmaznak intermolekuláris keresztcsúcsokat. Ilyenkor a forgó koordináta-rendszerben (*rotating frame*) értelmezett Overhauser spektroszkópiát (ROESY) érdemes használni, ahol a keverési idő (*mixing time*) alatt nem a z tengely mentén, hanem egy x,y -komponenseket is tartalmazó effektív tengely mentén (és a spektrométer ω_0 -tól eltérő ω_{eff} frekvenciánál) történik a keresztrelaxáció, így ROESY 1D és 2D spektrum felvételekor gyakorlatilag tetszőleges molekulaméretre detektálhatunk mag Overhauser növekményeket. A τ_c az oldat viszkozitásával is befolyásolható, növelésével lassítható a molekuláris forgás.

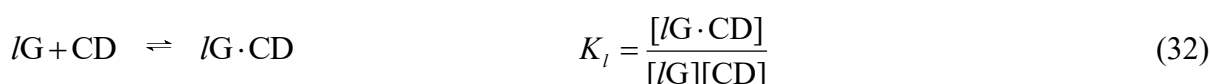
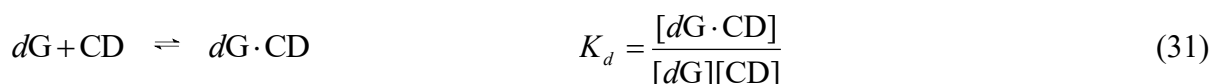


5. ábra. a.: A natív ciklodextrinek metinprotonjainak sematikus elhelyezkedése; b.: Kálium helvolát (szteroid) és β -CD 1:2 komplexére ROESY térközeliségek alapján levezetett szerkezeti modell [111]

Az előzőekben bemutatott $\Delta\delta$ vagy NOE alapú szerkezetvizsgálatok alapfeltétele, hogy a CD éles, jól megkülönböztethető jeleket adjon. A szimmetria miatt a natív vagy pl. permetilezett ciklodextrinek néhány egyszerű jelcsoportot adnak, amelyek egyértelműen szénkötésű protonjaihoz rendelhetők [95]. Az izomertiszta (pl. monoszubsztituált CD-k) jelhozzárendelése hosszadalmas munkával ugyan, de elvégezhető és intermolekuláris NOE vizsgálatok útján részletes 3D térszerkezeti modell megalkotását teszi lehetővé [107]. Mivel a random szubsztituált CD-származékok (CD-elegyek) igen sokféle kémiai környezetű metilén- és metinprotont tartalmaznak, így a 3-4, valamint a 4,5-5 ppm tartományokban zsúfolódó, átfedő, széles multiplettjeikre mutató intermolekuláris NOE-k, csak a komplexek durvább „felbontású”, közelítő szerkezeti leírását teszik lehetővé [109].

3.2.4. Az enantiomerek ciklodextrin-komplexei

Egy racém G vendégmolekula *d*- és *l*-enantiomerje külön-külön képez 1:1 összetételű zárványkomplexet a ciklodextrinnel a következő egyenletek szerint:



A diasztereomer komplexek stabilitása általában eltér, termodinamikai preferencia is jellemzi az enantioszelektív molekuláris felismerést. Ennek mérőszáma a királis szelektivitás vagy enantioszelektivitás, mely definíció szerint 1-nél nem kisebb mennyiség, ezért

$$\alpha_c := \begin{cases} K_d / K_l & \text{ha } K_d > K_l \\ K_l / K_d & \text{egyébként} \end{cases} \quad (33)$$

amely egyúttal a királis folyadékkromatográfiás elválasztás egyik kulcsparamétere [112,83,37].

Az enantiomer-kompetíció miatt a három komponens anyagmérleg-egyenlete is módosul:

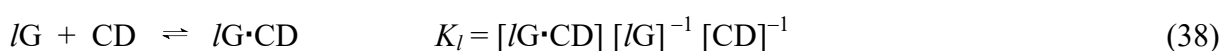
$$c_{dG} = [dG] + [dG \cdot CD] = [dG](1 + K_d[CD]) \quad (34)$$

$$c_{lG} = [lG] + [lG \cdot CD] = [lG](1 + K_l[CD]) \quad (35)$$

$$c_{CD} = [CD] + [dG \cdot CD] + [lG \cdot CD] = [CD](1 + K_d[dG] + K_l[lG]) \quad (36)$$

3.2.4.1. Enantioszelektív komplexstabilitási állandók meghatározása oldatfázisban HPLC-vel

Akirális körülmények között az enantiomerek a kromatográfiában nem különböztethetők meg, azonban királis szelektor mozgófázisba keverésével már eltérő retencióval eluálódnak. Ez a kialakult zárványkomplexek eltérő stabilitásának és nem a komplex állófázison történő visszatartásának következménye[&]. Mindkét enantiomer relatív erősen kötődik a szelektorhoz és legtöbb esetben 1:1 sztöchiometriájú komplexet képez vele:



Az általános tárgyalás kedvéért feltételezzük, hogy $K_d > K_l$, ekkor a d enantiomer eluálódik előbb t_d retenciós idővel, majd az l enantiomer t_l retenciós idővel [113]. A vendégmolekula elúciós idejét (t_G) és a holtidőt (t_0) királis szelektor nélküli mozgófázisban határozzuk meg. A CD jelenlétében a visszatartási tényezőt a következő egyenlet szerint számíthatjuk [113]:

$$k = k_G (1 + K_d [CD])^{-1} \quad (39)$$

ahol k_G a CD távollétében mért visszatartási tényező. Ha az 1:1 komplex mellett 1:2 komplex koncentrációja sem elhanyagolható, akkor k a következőképpen alakul:

$$k = k_G (1 + K_{d,1} [CD] + K_{d,1} K_{d,2} [CD]^2)^{-1} \quad (40)$$

Az egyenleteket kissé átrendezve a következő összefüggésekhez jutunk:

$$k^{-1} = k_G^{-1} + K_{d,1} [CD] k_G^{-1} \quad (41)$$

illetve:

$$k^{-1} = k_G^{-1} + K_{d,1} [CD] k_G^{-1} + K_{d,1} K_{d,2} [CD]^2 k_G^{-1} \quad (42)$$

[&] Kapilláris zóna elektroforézisben az enantiomerek azonos CD-affinitása ($K_d = K_l$) esetén is megvalósítható az elválasztás, ha a képződő komplexek alakja, hidratált ionsugara, így mozgékonyasága eltérő [96]. ¹H NMR-ben is lehetséges enantiomer csúcselbontás $K_d = K_l$ esetén, ha a diasztereomer $dG \cdot CD$ és $lG \cdot CD$ szerkezeti különbsége miatt $\delta_{dG \cdot CD} \neq \delta_{lG \cdot CD}$ megvalósul [83].

Ezen egyenletekből megállapítható, hogy az 1:1 sztöchiometriájú komplex esetén a k reciproka a CD koncentráció lineáris függvénye, míg az 1:2 komplex képződésekor a k reciproka és a CD koncentráció között parabolikus összefüggés figyelhető meg.

A kromatográfiás paraméterekből a komplex stabilitási állandókat is meghatározhatjuk, ha a visszatartási tényező definícióját felhasználjuk és a (41) egyenletet átrendezzük:

$$K_d = (t_G - t_d)(t_d - t_0)^{-1}[\text{CD}]^{-1} \quad (43)$$

A (39)-(43) összefüggéseket analóg módon az l -enantiomerre is felírhatjuk. Mivel a királis szelektor koncentrációja (c_{CD}) jóval nagyobb a vizsgálandó komponens koncentrációjánál (c_G), így a $[\text{CD}]$ -t közelíthetjük a mozgófázisban alkalmazott ciklodextrin összkoncentrációjával (c_{CD}) [83]. Az enantiomerek komplex stabilitási állandóinak aránya a királis szelektivitás (α_c), mely a kromatográfiás paraméterekből a következő egyenlet szerint számítható:

$$\alpha_c = \frac{(t_G - t_d)(t_l - t_0)}{(t_G - t_l)(t_d - t_0)} \quad (44)$$

Az $\alpha_c > 1$ az enantiomer elválasztás szükséges, de nem elégséges feltétele.

3.2.4.2. Enantioszelektív komplexstabilitási állandók meghatározása NMR titrálással

Enantiomerek oldatbeli NMR spektruma akirális környezetben azonos, kivéve az enantiomer-önasszociáció (*self-induced recognition of enantiomers*, SIRE) ritka esetét. Megfelelő királis oldószerkomponens vagy komplexképző („NMR shiftreagens”) hozzáadására az enantiomerekből tranziens diasztereomer komplexek képződnek, melyeknek (a különböző királis környezet hatására) elvileg eltérőek az ^1H (és a ^{13}C ...) NMR paraméterei. Leglátványosabb a $\delta^{dG,i}$ és $\delta^{lG,i}$ kémiai eltolódások különbsége a diasztereomer komplexekben (a csatolási állandók vagy relaxációs tulajdonságok eltérése ritkábban okoz látható változást), ami úgy mutatkozik a spektrumban, hogy a királis adalék hozzáadására a racemát multipliettjei „megkettőződnek” (különböző mértékben tolódnak el: $\Delta\delta^{dG,i} \neq \Delta\delta^{lG,i}$). A gyakorlatban csak bizonyos protonok jelei válnak annyira külön, hogy azt analitikai célokra tudjuk használni: integrálásukkal enantiomer arányt állapítsunk meg [114] vagy a kémiai eltolódások CD-koncentráció függéséből az alább tárgyalt módon enantioszelektív komplexstabilitási állandókat számítsunk. Egy adott CD-koncentrációnál az enantiomerek ugyanazon

i. spinjére mérhető kémiai eltolódás-különbség nagysága az „enantiomer-felhasadás” (*chemical shift non-equivalence* [82]) $\Delta\delta^{G,i} = |\delta^{dG,i} - \delta^{lG,i}|$, míg ennek telítési CD-koncentrációknál észlelhető határértéke (*limiting shift non-equivalence*) az *i.* mag kémiai eltolódásainak különbsége a két komplexben, $\Delta\delta_{\infty}^{G,i} = |\delta_{dG-CD}^i - \delta_{lG-CD}^i|$.

Tárgyalásunk további részében csak az 1:1 komplexképződés esetére szorítkozunk. Egyetlen enantiomer oldatának CD-vel történő titrálásakor a 3.2.3.4. fejezetben leírt módszerekkel lehet a komplexet jellemző K_d és δ_{dG-CD}^i (vagy a szabad vendégmolekula kémiai eltolódásaihoz viszonyított $\Delta\delta_{dG}^i = \delta_{dG-CD}^i - \delta_G^i$) paramétereket meghatározni. A két enantiomer külön NMR titrálása gyakori az irodalomban (pl. [97]), azonban dupla időbefektetést jelent, ráadásul számos vegyületnél nem járható út, mert csak az egyik (bioaktív) enantiomer hozzáférhető. A racemát titrálásának előnyeit [86] és gyakorlati szempontjait részletesen tárgyalja Tárkányi Gábor [84]. Összefoglalva, azon magok titrálási görbéit érdemes ilyenkor bevonni az értékelésbe, amelyekre $\delta^{dG,i}$ és $\delta^{lG,i}$ biztonsággal megkülönböztethető, ez az adott vonalszélességek, spektrális felbontás függvénye. A $\Delta\delta^{dG,i}$ adatsor (28) egyenlet szerinti értékelése torzított, „látszólagos” K_d kötődési állandóhoz vezetne, hiszen nem veszi figyelembe, hogy az oldatban jelenlévő CD egy része a másik enantiomerrel reagál. Az *enantiomer-kompetíció* figyelembevételére két lehetőség kínálkozik. Használhatunk olyan programot (például OPIUM [115]), amely minden titrálási pontban megoldja (iteratív módszerrel) a (34) és a (35) anyagmérleg-egyenleteket és az egyensúlyi CD-koncentrációkkal illeszti a következő egyenletet szimultán mindkét enantiomer *i.* magjának (esetleg összes magjának) adatsorára (adatsoraira):

$$\Delta\delta^{dG,i} = \frac{\Delta\delta_{dG}^i K_d [CD]}{1 + K_d [CD] + K_l [CD]} \quad (45)$$

$$\Delta\delta^{lG,i} = \frac{\Delta\delta_{lG}^i K_l [CD]}{1 + K_d [CD] + K_l [CD]} \quad (46)$$

A másik lehetőség Tárkányi Gábor egyszerűsítő feltételezését alkalmazni a háromkomponensű egyensúlyi rendszer „szétcsatolására” két kétkomponensű rendszerré: dG adatsora torzításmentes K_d stabilitási állandót szolgáltat, ha a (27) vagy (28) egyenlet illesztésének bemeneti adataként a c_{dG} értékét duplázzuk (l. a „2. módszert” [84]-ban). Az

/G adatsor független kiértékelésével a másik enantiomerre specifikus kötődési állandóhoz jutunk.

3.2.5. A ciklodextrinek analitikai felhasználása

A ciklodextrinek és származékainak nagy jelentősége van királis és konstitúciós izomer anyagok elválasztásában egyaránt [116]. A Cyclolab Kft. által készített statisztika adatai azt mutatják, hogy míg 2000-ben a kapilláris elektroforézis (CE) technika uralta ezt a területet, majd ezt követte a gázkromatográfia (GC) [117], addig napjainkra egyre nagyobb teret hódít a folyadékkromatográfia. Mivel a vékonyréteg kromatográfiának (TLC) behatárolt a hatékonysága és a lineáris tartománya sem túl széles, így a TLC alkalmazása a királis elválasztásokban elenyésző.

A királis gázkromatográfiás elválasztásokban túlnyomó részt kapilláris oszlopokat alkalmaznak, állófázishoz kötött ciklodextrinnel. Széles körben használják a peralkil-szubsztituált- (főként permetilezett- β -CD), a szilil-szubsztituált és az acil-alkil-szubsztituált CD-ket, főként aminosavak elválasztására, de egyéb izomerek esetén is [118].

A szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC) kevésbé alkalmazott technika a királis vizsgálatokra, bár a mozgófázis alacsony viszkozitása és a relatív nagy permeabilitása gyors elválasztást eredményezhet nagy hatékonyságú oszlopokon. A GC-hez képest az SFC technikával alacsonyabb hőmérsékleten tudunk nagy szelektivitást elérni. A másik nagy előnye, hogy poláris vegyületeket lehet elválasztani származékképzés nélkül alacsony hőmérsékleten [119]. Az SFC esetén az állófázishoz kötött ciklodextrinek és származékaikat használják elsősorban, csak néhány irodalomban találunk mozgófázisban történő alkalmazásra példát.

A kapilláris elektroforetikus (CE) elválasztásokra alkalmazzák a ciklodextrinek a legszélesebb körben. Ennek a technikának óriási előnye, hogy nagy a hatékonysága, gyors az analízis, gyors a módszerfejlesztés, egyszerű a minta-előkészítés még biológiai mátrixokból is, kicsi az anyagigénye és számos lehetőség áll rendelkezésre az enantiomer sorrend megfordítására, a minor komponens mennyiségi meghatározásának megkönnyítésére. A natív ciklodextrinek közül a legszélesebb körben a β -CD terjedt el, de napjainkban megnőtt a származékok felhasználásának jelentősége is.

Sybilska és munkatársai 1982-ben elsőként alkalmazták a β -cyclodextrin HPLC-s elválasztásokra mozgófázisban királis szelektorként akirális állófázison [120]. A CD-k

mozgófázisban való felhasználása többek között azért is népszerű, mert alacsony az UV abszorbanciájuk [121]. A ciklodextrinek állófázishoz kötött formában is nagyon elterjedtek, itt feltétlenül meg kell említeni Armstrong és munkatársainak úttörő munkásságát [122]. Az állófázishoz kötött ciklodextrinek hátránya, hogy az oszlopok általában alacsony hőmérsékleten használhatók a bomlás miatt. A bioanalitikai felhasználásuk népszerű, mivel speciális minta-előkészítés nélkül, közvetlenül injektálhatók a biológiai minták a ciklodextrin alapú állófázisokra [123,124].

A natív ciklodextrinekkel együtt a származékok is nagy jelentőségűek, mivel nagyobb koncentrációban használhatók jobb oldhatóságuk miatt. A funkciós csoportok beépítése növelheti a királis felismerés lehetőségét azzal, hogy további kölcsönhatást biztosítanak a minta számára, úgy mint a π - π , elektrosztatikus, dipól-dipól és a szterikus hatások, amelyek nem érhetők el a natív ciklodextrinekkel. A funkciós csoportok beépítése megváltoztatja az üreg méretét és ezzel a vizsgálandó molekula illeszkedését is, ezáltal természetes formájuktól jelentősen eltérő viselkedést mutathatnak.

3.3. A királis folyadékkromatográfiás elválasztások

A királis molekulák enantiomerjeinek különböző biológiai hatása lehet, így ezek előállításánál szükséges lehet a királisan szelektív szintézis megvalósítása vagy a racém anyagok gyártása után az enantiomerek szétválasztása, a tiszta, biológiailag aktív komponens kinyerése. A hatvanas évek Contergan-botránya óta [125] a királis (aszimmetria centrummal rendelkező, optikailag aktív) hatóanyagot tartalmazó gyógyszerek enantiomer arányának kérdése a hatóságok figyelmének középpontjába került. Sajnálatos módon bebizonyosodott, hogy a racém formában (enantiomer arány = 1:1) forgalomba hozott thalidomid nevű új gyógyszer-alapanyag teratogén (magzatkárosító) mellékhatásáért csak az egyik enantiomer a felelős. Azóta erősödik az a tendencia, hogy új gyógyszereket lehetőleg tiszta bioaktív enantiomerként (eutomerként) hozzanak forgalomba. Ebben az esetben az enantiomer gyógyszer másik enantiomerjét (tükörképi izomerjét), a disztomert ugyanúgy szennyezésnek kell tekintenünk, mint az anyavegyület hagyományos értelemben vett szennyezéseit.

Az enantiomer tisztaság meghatározása nagy kihívást jelent a gyógyszer-analitika számára. Az utóbbi évtized intenzív kutatásának eredményeként ma már akár biológiai mintákban is mérhetők az enantiomer koncentrációk, elsősorban királis HPLC- vagy királis

kapilláris elektroforetikus (CE) módszerekkel. Mivel az enantiomerek fizikai és kémiai tulajdonságában nincs különbség (kivéve a polarizált fény forgatási síkját), ezért hagyományos (akirális) elválasztástechnikai módszerekkel nem választhatók el. Királis elválasztásuk többféleképpen valósítható meg. Egy lehetséges csoportosítás szerint történhet: (i) akirális állófázison akirális mozgófázisban előzetes származékképzés után, (ii) akirális állófázison királis segédanyagot tartalmazó mozgófázisban vagy (iii) királis állófázison akirális mozgófázisban. Királis szelektorként, királis segédanyagként minden olyan molekula szóba jöhet, amely aszimmetria centrummal rendelkezik és kölcsönhatásba lép az elválasztandó enantiomerekkel. Ezek közül a leggyakoribbak (a teljesség igénye nélkül) a ciklodextrinek és származékaik, koronaéterek, epesavak, fehérjék és antibiotikumok. A legtöbb gyógyszer szerű molekulára, legszélesebb körben használható királis segédanyagok a természetes ciklodextrinek és azok származékai.

3.3.1. Az optimális elválasztási körülmények előrejelzésének lehetőségei

A napjainkig publikált több száz királis HPLC és elektroforetikus elválasztás tapasztalatai ellenére még mindig nehéz előre jelezni, hogy a vizsgálandó vegyület enantiomerjeinek elválasztására melyik ciklodextrin alkalmas. Enantiomerek NMR és elválasztástechnikai paramétereinek korrelációjával több kutatócsoport foglalkozott [126]. Owens és mtsai [82] gyors, ^1H NMR spektrum felvételén alapuló szűrő (*screening*) módszert dolgoztak ki a királis elválasztás módszerfejlesztésének támogatására, ahol az elválasztandó racemát oldatához egyenként adagolták 1:1 molarányban az egyes CD-eket és egy kiválasztott ^1H NMR spektrumjel $\Delta\Delta\delta^G$ enantiomer-felhasadásából próbáltak következtetni a CE-ben tapasztalható enantioszelektivitásra. Nem minden CD származékra működött a módszer és később Tárkányi Gábor a Norgestrel példáján keresztül bizonyította [84], hogy az egyetlen CD koncentrációnál mérhető $\Delta\Delta\delta^G$ nem a megfelelő változó a királis elválasztás előrejelzéséhez, mert az erősen szerkezetfüggő és magról magra változó $\Delta\Delta\delta_{\infty}^{G,i}$ paraméteren alapul. Helyette a racemát ciklodextrinnel az ^1H NMR titrálást ajánlotta a K_d és K_l stabilitási állandók meghatározására, amelyekből a (33) egyenlettel számítható α_c enantioszelektivitás sokkal megbízhatóbb jelzője a királis HPLC elválasztásnak [84].

Az NMR adatokon alapuló szerkezeti modelleket széleskörűen használják (királis) elválasztások mechanizmusának, molekuláris alapjainak a megértésére vagy enantiomer

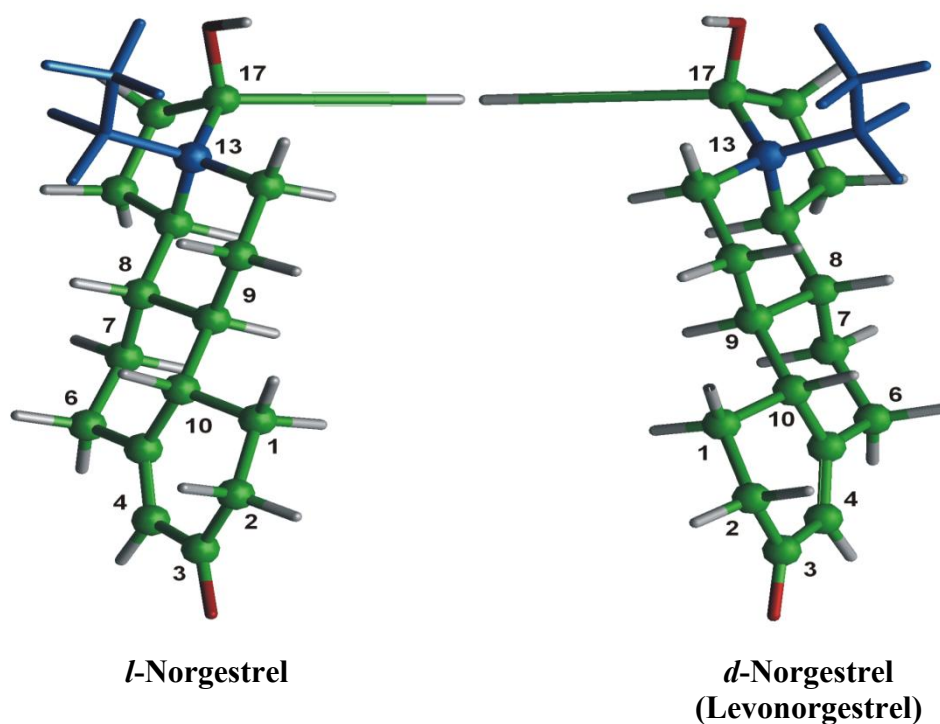
retenciós/migrációs sorrend változás magyarázatára [86]. Elsősorban Holzgrave [126] és Chankvetadze [80,96] publikációi jelentősek ezen a területen.

3.3.2. A hőmérséklet szerepe az enantiomerek elválasztásában

Az enantiomerek folyadékkromatográfiás elválasztásánál a kedvezőbb eset – az enantiomer szennyezés eluálódik elől – a hőmérséklet vagy a mozgófázis összetételének változtatásával befolyásolható [126-129]. Az enantiomerek elválasztására számos tanulmány született, amelyben a hőmérséklet-emelés hatását vizsgálták királis állófázisokat alkalmazva aminosavak [130,131], gyógyszer hatóanyagok [132] elválasztására, valamint a bioanalitikában [133]. A királis állófázisok általában érzékenyek a hőmérsékletre, mindösszesen 50–60°C-ig használhatók. Így jóval elterjedtebben vizsgálják a hőmérséklet hatását akirális állófázison királis mozgófázist alkalmazva pl. szteroidok [134-139] és egyéb vegyületek [112,140] enantiomerjeinek elválasztására.

3.4. Levonorgestrel

Munkám során királis modellvegyületként a Richter Gedeon Nyrt. által régóta gyártott és forgalmazott szteroid hatóanyagot, a Levonorgestrelt vizsgáltam. A Levonorgestrel azonos a racemátként is gyártott *d,l*-Norgestrel biológiailag aktív enantiomerjével (*d*-Norgestrel) [145]. A Levonorgestrel egy második generációs szintetikus progeszteron, mely több fogamzásgátló készítmény hatóanyaga. A 6. ábrán a vegyületek sematikus képe látható.



6. ábra A *d*- és az *l*-Norgestrel sematikus képe

3.4.1. A Levonorgestrel akirális és királis analitikája

A Levonorgestrel hatóanyagot totálszintézissel, bonyolult kémiai lépések útján állítják elő. Az összetett, többlépéses szintézis számtalan szennyezés forrása lehet, ezért a hatóanyag tisztaságvizsgálata nagy körültekintést igényel.

A Norgestrel hatóanyag alapos analitikai kutatása több mint 20 évvel ezelőtt kezdődött a Richterben. A *d*-Norgestrel, más néven a Levonorgestrel hatóanyag szennyezéseinek azonosítására, elválasztására és meghatározására Gazdag Mária, Görög Sándor és munkatársaik elválasztástechnikai és spektroszkópiai módszereket alkalmaztak [146-148].

A Levonorgestrel hatóanyag akirális vizsgálatára mind az amerikai, mind az európai gyógyszerkönyv tartalmaz előíratot. Az amerikai gyógyszerkönyv [149] vékonyréteg kromatográfiás módszert, míg az európai gyógyszerkönyv [150] folyadékkromatográfiás módszert ír elő az akirális tisztaságvizsgálatra. Fontos az antipód (*l*-Norgestrel), mint királis szennyezés mennyiségi meghatározása is, melyhez az irodalomban találunk kapilláris elektroforetikus, kapilláris elektrochromatográfiás (CEC) [84,151,152] és folyadékkromatográfiás módszereket is [139,141-144,153]. A hatóanyag optikai tisztaságát forgatóképesség méréssel határozzák meg a gyógyszerkönyvekben, 5%-os kimutatási határral. A fordított fázisú HPLC módszerek sokkal érzékenyebbek, a tized, vagy akár a század százalék alatti mennyiségek kimutatására is alkalmasak.

Gazdag Mária és munkatársai kísérleteikben az eltérő üregméretű natív ciklodextrinek közül, egyedül a γ -CD-t találták megfelelő királis szelektornak a Norgestrel enantiomerek elválasztására [141]. Az optimálás során vizsgálták az állófázis, a szerves oldószer fajtája, koncentrációja, a hőmérséklet (25–50°C között) és a γ -CD koncentráció hatását az elválasztás szelektivitására és hatékonyságára [141-143]. A β -CD királis szelektor alkalmazásával Lamparczyk [139] és Zarzycki [137] sem érték el teljes királis elválasztást a hőmérséklet csökkentésével sem.

4. Célkritizések

A gyógyszerkutatásban, gyógyszergyártásban, gyógyszer-analitikában igen hangsúlyos az igény arra, hogy a folyamatokat felgyorsítsák és a lehető legrövidebb idő alatt hozzanak forgalomba új gyógyszereket, valamint a rutin gyártások, ellenőrzések idejének csökkentésével a piaci igényeknek is a leggyorsabban tudjanak megfelelni. Többek között emiatt is nőtt meg a jelentősége az ún. „gyors kromatográfiás” kutatásoknak, elválasztásoknak, melyeknek egyik képviselője a HTLC. Jelen munkámban elsődleges célom volt a hőmérséklet hatásának tanulmányozása a Levonorgestrel szteroid hatóanyag akirális és királis HPLC analízise során.

A hatóanyag akirális szennyezéseinek széles polaritása miatt a szilikagél alapú állófázison történő elválasztás hosszú analízis időt eredményez. Feladatul tűztem ki, hogy *akirális* rendszerben egy olyan nem szilikagél alapú állófázist válasszak, amely széles hőmérséklet-tartományban használható. Munkám során cirkónium-dioxid alapú oszlopon (Discovery Zr-Carbon_{C18}) tanulmányoztam az elválasztás hatékonyságát befolyásoló paramétereket (hőmérséklet, áramlási sebesség, szerves oldószer minősége és mennyisége). Az elméleti összefüggések alkalmazhatóságát, azokból levezethető termodinamikai paraméterek változását vizsgáltam széles hőmérséklet-tartományban.

Az egyre szigorodó hatásági és gyógyszerkönyvi követelmények szükségessé teszik a királis gyógyszer hatóanyagokban – mint a Levonorgestrel is – előforduló enantiomer szennyezés pontos mennyiségi meghatározását. A doktori munkámban elemeztem a mozgófázisban alkalmazott királis adalék anyagok fajtáinak (natív és permetilezett ciklodextrinek) és koncentrációjának; a szerves oldószerek fajtáinak és mennyiségének; a hőmérsékletnek és az áramlási sebességnek a hatását az elválasztásra. Különböző hőmérsékleteken számítottam az enantiomerek stabilitási állandóit, a királis szelektivitás értékét, valamint a termodinamikai jellemzőket. Nem csak a mozgófázisban, hanem az állófázishoz kötött királis szelektor (permetilezett ciklodextrin) alkalmazhatóságára is végeztem kísérleteket.

Célul tűztük ki a királis elválasztás mechanizmusának mélyebb megértését NMR spektroszkópiai módszerek alkalmazásával: a racemát ¹H NMR titrlásával az enantiomerek kötődési állandóját határoztuk meg (natív vagy permetilezett) ciklodextrinhez, valamint ezen állandók hőmérséklet függését a HPLC-vel kapott termodinamikai paraméterek független alátámasztására; Job [87] módszerrel a képződő komplex(ek) sztöchiometriáját vizsgáltuk,

2D NOESY (ROESY) felvételekkel a kötődésért felelős szteroid molekularészletet próbáltuk azonosítani.

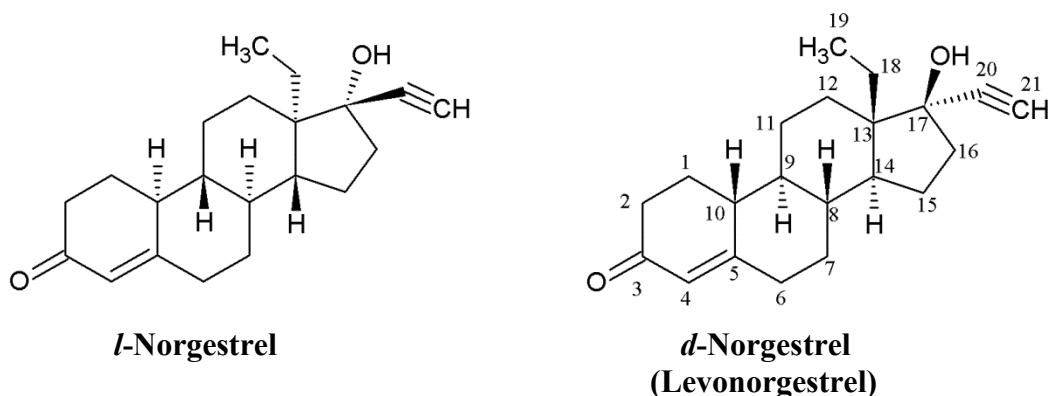
5. Az anyagok és módszerek leírása

Ebben a fejezetben a felhasznált vegyszereket, az alkalmazott analitikai kémiai módszereket és a minta-előkészítést mutatom be.

5.1. Felhasznált vegyszerek

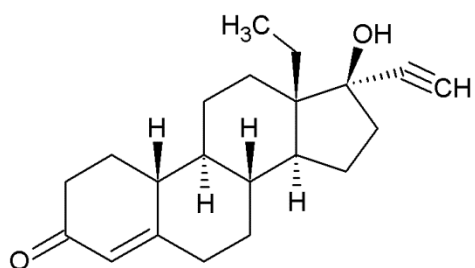
5.1.1. Vizsgált vegyületek

Kísérleteink során a Richter Gedeon által gyártott és forgalmazott szteroid hatóanyagot, a Norgestrelt használtuk. Királis kísérleteinkhez a racém Norgestrelt vizsgáltuk, azaz a *d*- és az *l*-Norgestrel 1:1 arányú keverékét (7. ábra).

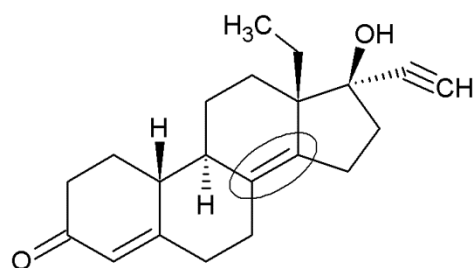
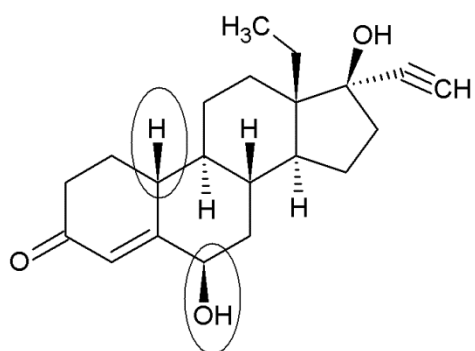
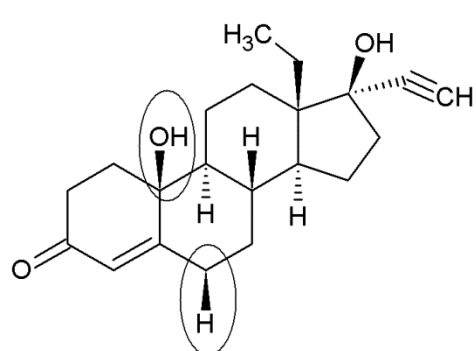
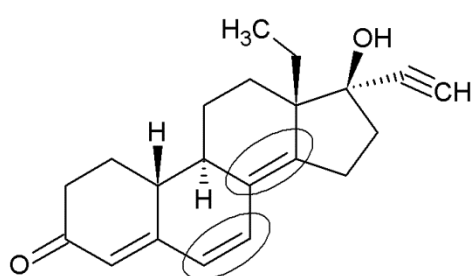


7. ábra *d*- és *l*-Norgestrel szerkezeti képlete

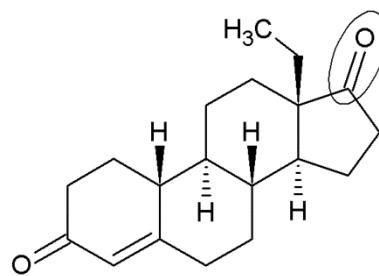
Akirális vizsgálataimhoz a Levonorgestrelt és ismert, általam kiválasztott szennyezéseit használtam modell elegyként (8. ábra). A vegyületek kiválasztásakor elsősorban azt tartottam szem előtt, hogy az ismert szennyezések közül olyan komponenseket válasszak, amelyek széles polaritástartományba tartoznak. Mindegyik vizsgált vegyület az elérhető legnagyobb tisztaságú volt.



Levonorgestrel


 $\Delta^{(8,14)}$ -Levonorgestrel

6 β -OH-Levonorgestrel

10 β -OH-Levonorgestrel


Levonorgestrel-ABC-triën



Levodion

8. ábra A Levonorgestrel és szennyezéseinek szerkezeti képlete, a főkomponenstől való eltéréseket kiemeléssel jelölve

5.1.2. Ciklodextrinek

A felhasznált ciklodextrinek (α -, β -, γ -, PM- α -, PM- β -, PM- γ -CD) analitikai tisztaságú vegyszerek voltak, melyek egy része a Cyclolab Kft-től (Budapest, Magyarország) származott, míg a többi a Wacker-Chemie Kft-től (Burghausen, Németország). A felhasznált ciklodextrineket nem tisztítottuk, a HPLC és az NMR vizsgálatokhoz Karl Fischer titrálással meghatároztuk a pontos víztartalmukat.

5.1.3. Oldószerek, eluensek

HPLC mérésekhez gradiens minőségű acetonitrilt és metanolt (Merck, Darmstadt, Németország) használtam. Milli Q (Millipore Corporation, Bedford, Mass, USA) víztisztítóval előállított, 0,22 μ m-es membránszűrőn átszűrt vizet alkalmaztam. NMR mérésekhez nehézvizet, CD₃OD és C₂D₅OD oldószereket használtunk, melyeknél a deutérium atomaránya minden esetben 99,8% feletti volt (Merck, Darmstadt, Németország).

5.2. Analitikai módszerek

5.2.1. Akirális HPLC

A vizsgálatokhoz egy Agilent 1100 HPLC (Waldbronn, Németország) készüléket használtam, mely automata mintaadagolóval, gradiens pumpával és dióda soros detektorral felszerelt. Minden analízis izokratikus módban történt. Az oszloptér hőmérsékletét Polaratherm Series 9000 (Salt Lake City, USA) termosztáttal kontrolláltam, amely a mozgófázis előfűtését és detektor előtti hűtését is végezte $\pm 0,5^\circ\text{C}$ pontossággal. Az előfűtő egység hőmérséklete külön szabályozható, azonban a mérések során azonos hőmérsékletre állítottam az oszloptér hőmérsékletével (50–150°C). A kifolyó mozgófázis hőmérsékletét 40°C-ra hűtöttem a megbízható és reprodukálható detektálás érdekében. A detektálást minden esetben 244 nm-es hullámhosszon végeztem.

Az akirális tisztaságvizsgálati kísérletekhez Discovery Zr-CarbonC₁₈ (Zr-CarbonC₁₈, Supelco, Bellefonte, USA) 3,5 μ m, 150 mm x 4,6 mm oszlopot használtam. A mozgófázis metanol és víz, valamint acetonitril és víz különböző arányú elegye volt (a pontos összetételt a kromatogramok bemutatásakor tüntetem fel). A modelloldat a Levonorgestrelt és szennyezőseit egyenként 0,01 mg/ml koncentrációban tartalmazta. A modelloldathoz az egyes

komponensek 1 mg/ml koncentrációjú metanolos oldatát 100-szorosára hígítottam metanol-víz 1:1 (v/v) arányú elegyével. A kapott oldat 20 µl-ét injektáltam. A mintatér hőmérsékletet 25°C-on tartottam. Az adatgyűjtés és kiértékelés az Agilent ChemStation (Rev.A.10.02.) szoftverrel és a ChemStore (Rev.B.02.02.) adatbázisgyűjtővel történt. A kapott adatokat Microsoft Excel munkalapon összegeztem. A számított visszatartási tényező természetes alapú logaritmus ($\ln k$) értékeket a hőmérséklet reciprokjának függvényében ($1/T$) az Origin® programban ábrázoltam és illeszttem a szükséges görbéket, a kapott egyenletekből termodinamikai adatokat adtam meg. A számított elméleti tányérmagasság (H) értékeket a lineáris áramlási sebesség (u) függvényében ábrázoltam, majd a pontokra a van Deemter egyenletnek (1) megfelelő nemlineáris görbét illesztettem.

5.2.2. Királis HPLC

A királis tisztaságvizsgálat során az előző fejezetben bemutatott készüléket használtam. Mivel a királis vizsgálatokban a hőmérsékletet 10–50°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$ pontosság) tartományban változtattam, így az oszloptér hőmérsékletének ellenőrzése a beépített termosztáttal történt, csökkentve az oszlopon kívüli zónaszélesítő hatásokat. A vizsgálatok során különböző állófázisokat alkalmaztam:

- Luna C₁₈(2) (Phenomenex, Torrance, MA, USA) 3 µm, 50 mm x 3 mm, 100 Å
- Nucleodex α-PM, β-PM, γ-PM (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország) 5 µm, 30 mm x 4 mm

Az *akirális állófázis* használatakor a mozgófázis különböző koncentrációjú natív-, ill. permetilezett ciklodextrineket tartalmazott, a szerves összetevő metanol volt. A *királis állófázisokon* végzett vizsgálatokhoz víz–metanol különböző arányú elegyét használtam. (A pontos összetételeket az egyes eredmények leírásánál részletezem.) A vizsgált mintaoldat 0,1 mg/ml koncentrációjú racém Norgestrelt tartalmazott, melynek elkészítéséhez a mozgófázis összetételével megegyező arányú metanol-víz oldószert használtam. A 25°C-on termosztált mintaoldatból 3 µl-t injektáltam. Az adatgyűjtés, kiértékelés és az adatok összegzése az előző fejezetben bemutatott szoftverekkel történt.

5.2.3. A víztartalom meghatározása

A HPLC és az NMR mérésekhez felhasznált ciklodextrin oldatok pontos koncentrációjának meghatározásához figyelembe vettük a ciklodextrinek víztartalmát is, melyet coulometriás Karl Fischer titrálással határoztunk meg. A méréshez egy automata Mettler Toledo DL39 Karl Fischer titrátort használtunk, amely alkalmas 0,01–100% víztartalom gyors és pontos meghatározására. Az analízist megelőző kalibráció Hydranal®-Water Standard 10.0, 1,0 *m/v* %-os (1,0 ml-ben 10,00 mg víz, 1,0 %-os standard, Fluka-Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, Seelze, Németország) oldattal történt. 20 mg analitikai pontossággal bemért ciklodextrint Hydranal®-Coulomat AG mérőoldattal titráltunk. A titrálás eredményeként kapott adatok kiértékelését LabX 2.10. szoftverrel végeztük.

5.2.4. Az NMR mérések és kiértékelésük

Az NMR spektrumokat Varian NMR System típusú spektrométereken regisztráltuk 499,9 vagy 799,7 MHz proton mérési frekvencián. Mindkét készülék PFG $^1\text{H}\{^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\}$ hármaszonanciára alkalmas, ^{13}C érzékenységnövelt hűtött mérőfejjel volt felszerelve, melyekben a vevőtekerces és az előerősítő termikus zajfaktorát 25 K-es He cirkuláltatásával 20-30%-ra csökkentik, jelentős (majdnem tízszeres) érzékenységnövekedést eredményezve. Az adatgyűjtés VnmrJ 2.2C szoftverrel történt, a ChemPack 4.0-ban szereplő standard pulzusprogramok használatával.

Az NMR titrálásokat a HPLC mozgófázisnak megfelelő összetételű deuterált oldószerkeverékben, $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ 1:1 (*v/v*) elegyben végeztük. A törzsoldatok koncentrációját és elegyítési térfogataikat a 3.2.3. fejezetben részletezett egyenletek és a 3.2.3.4. fejezetben leírt kísérlettervezési szempontok szerint, Microsoft Excel munkalapon számítottuk ki, az egyensúlyi állandó becslésének felhasználásával (pl. irodalmi előzményből [84]). Mindkét törzsoldat 0,4 mM racém Norgestrelt tartalmazott, ciklodextrin pedig csak az egyikbe került 12 mM (permetilezett- β -CD esetén 40 mM) koncentrációban. A törzsoldatok elegyítésével szobahőmérsékleten készítettünk mintákat 100–1000 μl Eppendorf (Hamburg, Németország) analitikai pipetták (pontosság: $\pm 0,1$ – $1 \mu\text{l}$) használatával (össztérfogat: 600 μl), majd ezeket 5 mm-es standard NMR csövekbe szűrtük és egy fűtőblokkban (Stuart, Bibby Sterilin, Staffordshire, Anglia) 2 órán keresztül termosztáltuk a mérés előtt. A minták mágnesbe helyezése után 10-15 percet vártunk a termikus egyensúly beállítására. A mérőtekercesben

uralkodó tényleges hőmérsékletet Varian standard etilén-glikol-termométer minta kémiai eltolódás-különbségéből kalibráltuk és a titrálások során $\pm 0,5^\circ\text{C}$ pontossággal, $\pm 0,1^\circ\text{C}$ precizitással kontrolláltuk. Az ^1H spektrumokat legalább 12 ppm-es spektrumablakban, a légnedvesség abszorpciójával keletkező túlságosan nagy vízjel (4,8 ppm körül) esetén előtelítéssel vettük fel, 32-128 tranziens akkumulációjával. A kémiai eltolódás skálát a CD_3OD oldószerkomponensben nyomokban jelenlévő CHD_2OD multiplettjére (3,34 ppm) kalibráltuk. Trimetilszilil referencia-vegyületet nem használtunk, mert ezek nem kívánt kölcsönhatásba léphetnek a ciklodextrinnekkel. A Norgestrel egyes jól elkülönülő (részletesen l. a 6.2.2. fejezetben) ^1H multiplettjeinek kémiai eltolódását a VnmrJ program segítségével, század Hz pontossággal olvastuk le az ^1H spektrumokból. Ezen jelek szénkötésű protonokhoz rendelése (a triviális esetektől [84] eltekintve) egyes kiválasztott mintákra külön regisztrált 2D zTOCSY és (ritkábban) HSQC spektrumok alapján történt. Enantiomer-felhasadás ($\Delta\delta^{\text{G},i} \neq 0$) esetén az egyik „utolsó” titrálási pontban 0,8 mM *d*-Norgestrel oldat (CD_3OD - D_2O 1:1 v/v elegyben) addíciójával határoztuk meg, a kettőződött jel melyik fele melyik enantiomerhez tartozik.

A Norgestrel egyes protonjainak titrálási pontonként Hz-ben leolvasott és ppm-é konvertált $\delta^{\text{G},i}$ értékeit komplexkémiai eltolódásokká számítottuk át a $\Delta\delta^{\text{G},i} = \delta^{\text{G},i} - \delta_{\text{G}}^i$ képlet szerint. Ezen adatsorokat a CD és a Norgestrel összkoncentrációival együtt az OPIUM programba [115] beadva a (27) egyenlet szimultán nemlineáris regressziójával számítottuk ki az 1:1 komplexstabilitási állandó logaritmusát, illetve a $\Delta\delta_{\infty}^{\text{G},i}$ határeltolódásokat. Egyes jelek enantiomer-felhasadása esetén az adott (például a *d*) enantiomer jeleinek $\Delta\delta^{\text{dG},i} = \delta^{\text{dG},i} - \delta_{\text{G}}^i$ értékeiből végeztük el OPIUM-mal ugyanezt a számítást K_d és $\Delta\delta_{\infty}^{\text{dG},i}$ meghatározására. Ilyenkor az enantiomer-kompetíció figyelembevételéhez a [84] publikáció „2. módszerét” használtuk: „megdupláztuk” minden titrálási pontban a *dG* koncentrációját, hogy torzítatlan egyensúlyi állandót kapjunk (l. a 3.2.4.2. alfejezetben leírtakat is). Tovább is fejlesztettük ezt a módszert annyiban, hogy nem egyetlen, hanem szimultán több (2-7 közötti számú) mag $\Delta\delta^{\text{dG},i}$ titrálási görbéjét illesztettük (még mindig a (27) modellfüggvény felhasználásával), egyetlen közös, kisebb szórású K_d állandót és minden magra egyedi $\Delta\delta_{\infty}^{\text{dG},i}$ értékeket eredményezve. Hasonlóan jártunk el a másik enantiomer esetén is. Az OPIUM program elvileg lehetőséget ad mindkét enantiomer összes $\Delta\delta$ titrálási görbéjének együttes kiértékelésére is, tapasztalataink szerint azonban K_d , K_t , valamint a megfelelő $\Delta\delta_{\infty}^{\text{dG},i}$ és

$\Delta\delta_{\infty}^{G,i}$ ily módon való számítása általában rosszul kondicionált feladat (kivétekként l. a racemát permetilezett- α -CD-vel való titrálásának kiértékelését az 6.3.2.1. fejezetben). Kísérletet tettünk az OPIUM programmal 2:1 és 1:1 komplexek szimultán képződésének leírására is a β -CD-vel végzett titrálás kiértékelése során.

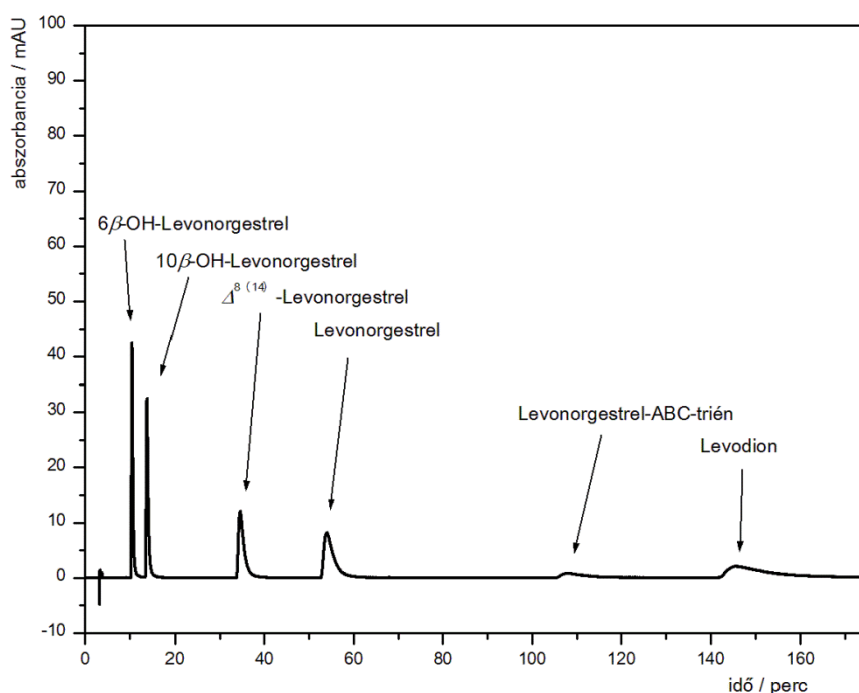
A sztöchiometria vizsgálatára a natív β - és γ -CD esetén Job módszerét is alkalmaztuk: $c_{CD} + c_{d\text{-Norgestrel}} = 0,5$ mM koncentrációösszegű, 13-15 oldatból álló mintasorozatot állítottunk össze és ^1H spektrumaikat 800 MHz-en, 25°C-on vettük fel az előző bekezdésben leírtak szerint, itt a CD jeleinek frekvenciáit is felhasználtuk a kiértékeléshez.

A képződő komplexek szerkezetének tanulmányozására egyes ciklodextrinek esetén 2D ROESY (keverési idő: 0,3 s; 2,3 kHz-es T-ROESY), illetve 800 MHz-en NOESY (keverési idő: 0,5 vagy 0,8 s) spektrumokat is regisztráltunk $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD-D}_2\text{O}$ 1:1 (v/v) oldószerkeletben, amelyben a d -Norgestrel akár 1-2 mM koncentrációban is feloldódott (a pontos koncentrációkat l. a 6. fejezetben). Jellemzően 16-32 tranzienssel, 128 inkrementummal készültek ezek a spektrumok, kalibrációjuk az oldószer 1,17 ppm-es ^1H maradékjelére történt.

6. Kísérleti eredmények

6.1. Emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfiás mérések akirális körülmények között

Amint az Irodalmi áttekintés és a Célkitűzés fejezetben olvasható, a Norgestrel hatóanyag akirális tisztaságvizsgálatára korszerű oszlopon kidolgozott módszert sem az irodalom, sem a gyógyszerkönyv nem tartalmaz. Így a vizsgált vegyületek polaritását, hőstabilitását, valamint a választott, emelt hőmérsékletre fejlesztett oszlop hőstabilitását is figyelembe véve az 50–150°C hőmérséklet-tartományt választottam az elméleti összefüggések tanulmányozására. Az előkísérletek alapján a vizsgálatokat 50°C-on 60% (v/v) metanol tartalmú vízben, 0,5 ml/perc áramlási sebességgel, izokratikus körülmények között kezdtem. A kapott kromatogram a 9. ábrán látható.



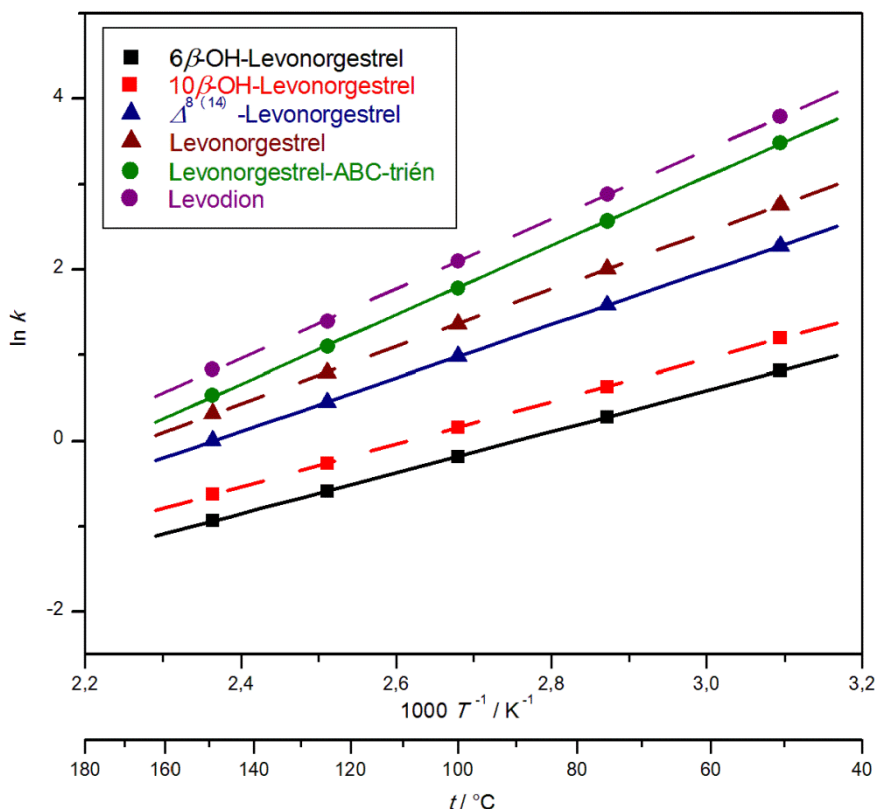
9. ábra Levonorgestrel hatóanyag és szennyezői **metanolos** mozgófázisban

Körülmények: oszlop: Discovery Zr-CarbonC₁₈ (150 x 4,6 mm, 3,5 μm); áramlási sebesség: 0,5 ml/perc; hőmérséklet: 50°C; mozgófázis: MeOH–H₂O 60:40 (v/v); injektált térfogat: 20 μl 0,01 mg/ml koncentrációjú modell oldatból; detektálás: 244 nm hullámhosszon

Fentiek alapján megállapítható, hogy az analízis idő túl hosszú, a csúcsalak az analízis végére torzul, lehetetlenné téve a pontos mennyiségi kiértékelést. A továbbiakban bemutatom azokat a lépéseket, melyekkel sikerült valamennyi vegyületet rövid analízis idő alatt elválasztani.

6.1.1. Összefüggés a retenció és a szerkezet között

Az elválasztás során alkalmazott hőmérséklet felső határát az egyik szteroid, a 6β -OH-Levonorgestrel szennyezés hőstabilitása szabta meg, mivel az 150°C feletti hőmérsékleten elbomlott. A hőmérséklet emelésével szisztematikusan csökkent a retenciós idő. A kapott retenciós adatokból visszatartási tényezőt számítottam, melyhez a holtidőt a metanol-víz 1:1 (v/v) arányú oldószer injektálásából mértem.



10. ábra $\ln k - 1/T$ görbék metanolos mozgófázisban

Körülmények: hőmérséklet-tartomány: $50\text{--}150^\circ\text{C}$, mozgófázis: MeOH–H₂O 60:40 (v/v), egyéb körülmények a 9. ábrán

Az $\ln k$ értékeket $1/T$ függvényében ábrázolva (10. ábra), a kapott pontsorokra illesztett egyenesek egyenleteiből (2. táblázat), két-két komponens között párhuzam figyelhető meg. Megállapítható, hogy a szerkezetileg hasonló vegyületek meredeksége szinte megegyezik. A korrelációs koefficiens értékek (r^2) minden esetben nagyobbak, mint 0,99. A 6β -OH-Levonorgestrel és a 10β -OH-Levonorgestrel szennyezések a hidroxi-csoport helyzetében, a $\Delta^{8(14)}$ -Levonorgestrel és a Levonorgestrel a C gyűrűn levő kettős kötésben, míg a Levonorgestrel-ABC-triën és a Levodion két kettős kötésben és a D gyűrűn levő funkciós csoportban is különböznek (8. ábra)

2. táblázat $\ln k - 1/T$ adatokra illesztett egyenesek egyenletei és korrelációs koefficiensük

Körülmények: áramlási sebesség: 0,5 ml/perc, hőmérséklet-tartomány: 50–150°C, mozgófázis: 60% (v/v) metanol

Komponens neve	egyenlet	r^2
6 β -OH-Levonorgestrel	$\ln k = 2400,67 T^{-1} - 6,61$	1,00
10 β -OH-Levonorgestrel	$\ln k = 2490,25 T^{-1} - 6,51$	1,00
$\Delta^{8(14)}$ -Levonorgestrel	$\ln k = 3113,98 T^{-1} - 7,36$	1,00
Levonorgestrel	$\ln k = 3341,98 T^{-1} - 7,59$	1,00
Levonorgestrel-ABC-triën	$\ln k = 4041,47 T^{-1} - 9,04$	1,00
Levodion	$\ln k = 4060,94 T^{-1} - 8,78$	1,00

A van't Hoff egyenlet (8) alapján az egyenesek meredekségéből számított entalpiaváltozás a szerkezetileg hasonló komponensekre alig különbözik, melyet a 3. táblázatban szemléltetnek.

3. táblázat A van't Hoff egyenlet alapján számított entalpiaváltozás

Körülmények: áramlási sebesség: 0,5 ml/perc, hőmérséklet-tartomány: 50–150°C, mozgófázis: 60% (v/v) metanol

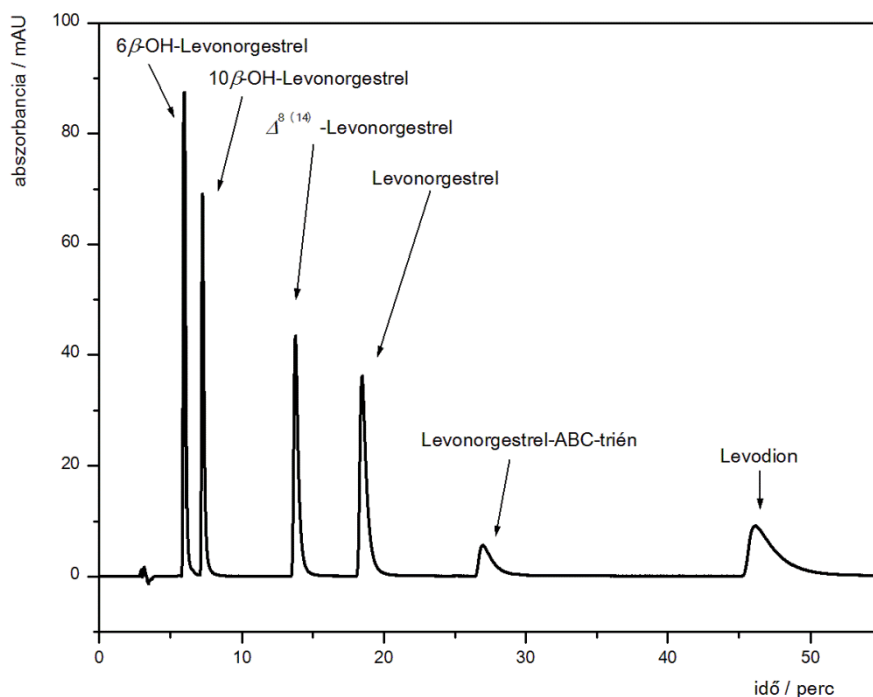
Komponens neve	ΔH° / kJ/mol
6 β -OH-Levonorgestrel	- 20,0
10 β -OH-Levonorgestrel	- 20,7
$\Delta^{8(14)}$ -Levonorgestrel	- 25,9
Levonorgestrel	- 27,8
Levonorgestrel-ABC-triën	- 33,6
Levodion	- 33,8

A vizes metanol tartalmú mozgófázissal kapott eredmények után megvizsgáltam a vegyületek viselkedését a vizes acetonitriles mozgófázisban is. Az azonos eluens erősséget biztosító mozgófázis összetételének számítása a (47) egyenlet szerint történt:

$$ST = \sum s_i V_i \quad (47)$$

ahol ST az eluens erőssége, V_i az oldószer térfogata %-ban és s_i az oldószerek egyedi oldószererőssége (metanolra 2,6; acetonitrilre 3,2; vízre fordított fázisban 0) [154,155].

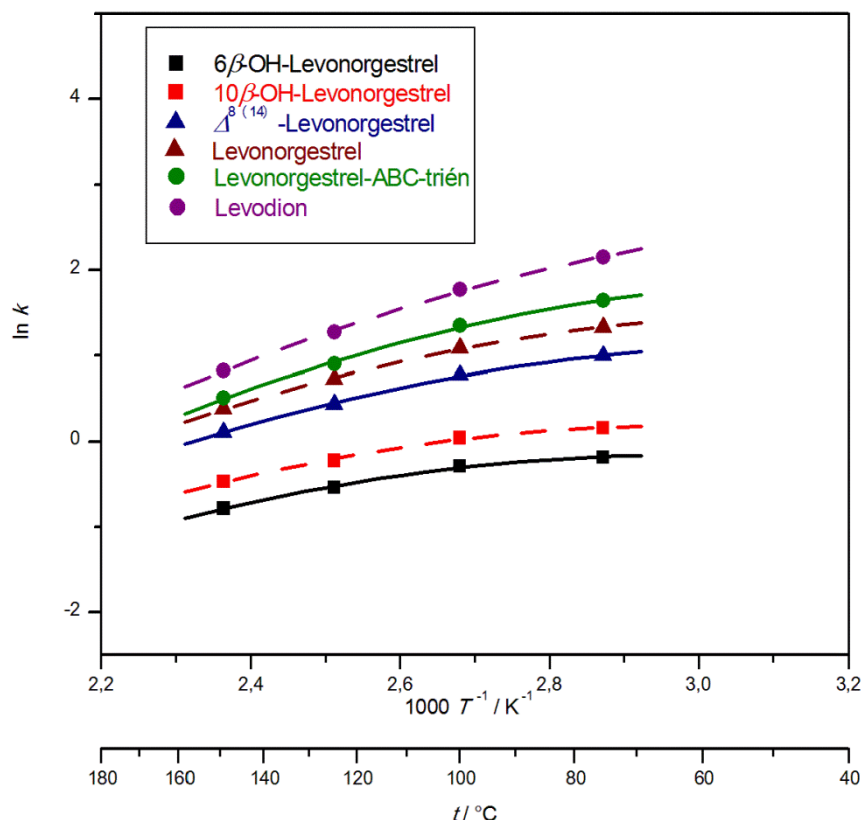
A 60% (v/v) metanol tartalmat fenti képlet alapján átszámítottam acetonitrilre és a kapott értéket (48,75%) 49%-ra kerekítettem. Az elválasztás a 11. ábrán látható.



11. ábra A Levonorgestrel hatóanyag és szennyezései **acetonitriles** mozgófázisban

Körülmények: áramlási sebesség: 0,5 ml/perc, hőmérséklet: 50°C; mozgófázis: ACN–H₂O 49:51 (v/v); egyéb paraméterek a 9. ábrán

A 9. és a 11. ábrán bemutatott kromatogramok alapján megállapítható, hogy az acetonitriles rendszerben az analízis idő jelentősen lecsökkent, de ez a rendszer is még meglehetősen hosszú analízis időt eredményezett és igen sok „tartalék” van benne.



12. ábra $\ln k - 1/T$ görbék acetonnitriles mozgófázisban

Körülmények: hőmérséklet-tartomány: 50–150°C, mozgófázis: 49% (v/v) ACN vízben, egyéb paraméterek a 9. ábrán

Az $\ln k - 1/T$ összefüggés metanolos rendszerben lineárist (10. ábra), míg a vizes acetonnitriles mozgófázisban maximum görbét (12. ábra) eredményezett, hasonlóan Guillaume és munkatársai eredményeihez [22]. A magyarázat a szerves komponensek eltérő tulajdonságaiban, a vizsgálandó molekulákkal és az állófázissal való összetett kapcsolatban keresendő, aminek tisztázására részletesebb vizsgálatokat nem végeztem.

Az acetonnitriles mozgófázisban az illesztett görbékre kapott egyenleteket a 4. táblázatban mutatom be. Az illesztett görbék másodfokúak voltak, a korrelációs koefficiens minden esetben nagyobb volt, mint 0,99.

4. táblázat $\ln k - 1/T$ adatokra illesztett görbék egyenletei és korrelációs koefficiensük

Körülmények: áramlási sebesség: 0,5 ml/perc, hőmérséklet-tartomány: 50–150°C, mozgófázis: 49% (v/v) acetonitril

Komponens neve	egyenlet	r^2
6 β -OH-Levonorgestrel	$\ln k = -1652,38 T^{-2} + 9852,04 T^{-1} - 14,84$	1,00
10 β -OH-Levonorgestrel	$\ln k = -1679,07 T^{-2} + 10054,38 T^{-1} - 14,86$	1,00
$\Delta^{8(14)}$ -Levonorgestrel	$\ln k = -1595,06 T^{-2} + 10113,16 T^{-1} - 14,89$	1,00
Levonorgestrel	$\ln k = -1668,21 T^{-2} + 10619,97 T^{-1} - 15,41$	1,00
Levonorgestrel-ABC-trién	$\ln k = -1833,44 T^{-2} + 11860,09 T^{-1} - 17,29$	1,00
Levodion	$\ln k = -1585,81 T^{-2} + 10930,69 T^{-1} - 16,15$	1,00

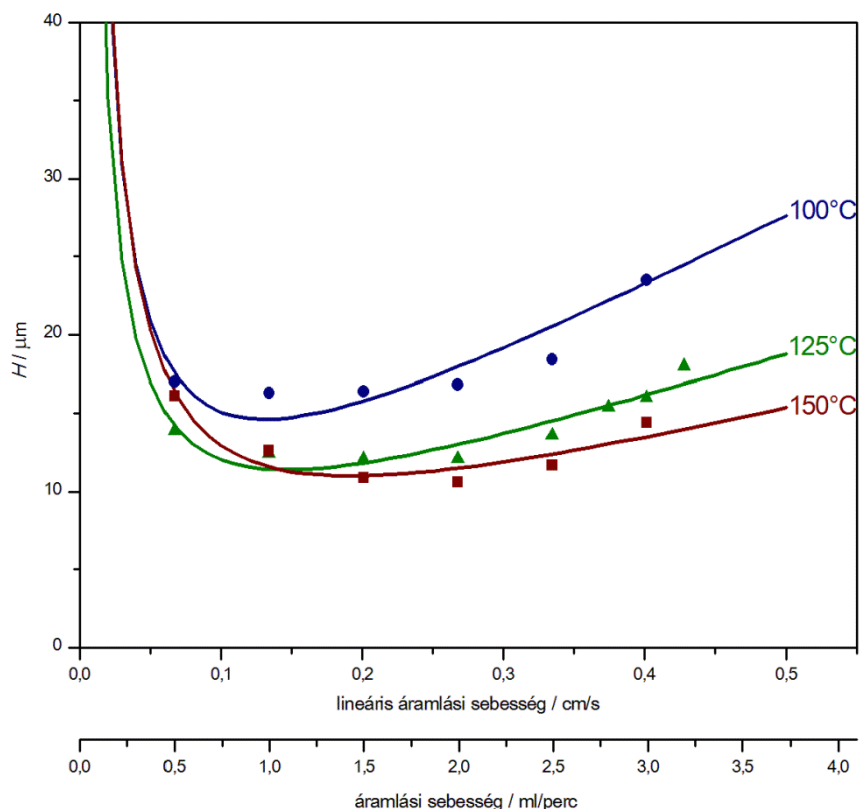
Mivel a Levonorgestrel és a szerkezetileg hasonló szennyezések retenciós viselkedése a hőmérséklet-változására hasonló a vizes metanolos és a vizes acetonitriles mozgófázisban, ezért a további lépések egy részében csak a Levonorgestrelt, mint főkomponenst vizsgálom.

Optimalizációs lépések:

- a hőmérséklet hatásának tanulmányozása,
- az eluens szerves összetevőjének vizsgálata,
- az áramlási sebesség változtatásának hatása.

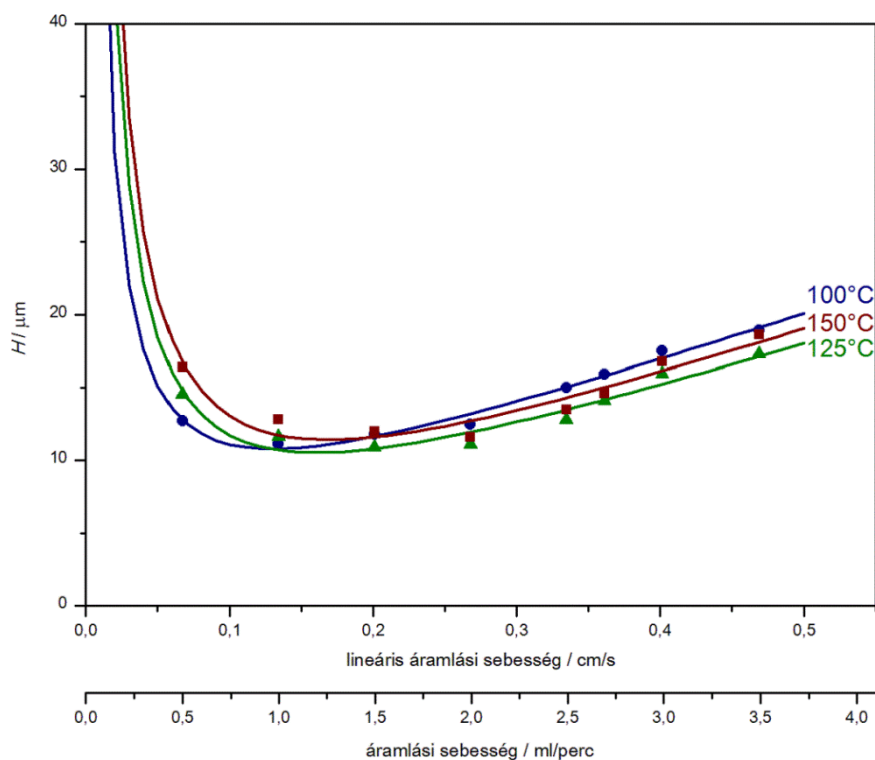
6.1.2. A hőmérséklet hatásának tanulmányozása

A kísérleteket 100–150°C tartományban végeztem mind vizes metanol, mind vizes acetonitriles mozgófázisban, mivel az előkísérletek alapján nem volt értelme a 100°C alatti méréseknek a hosszú analízis idő miatt. Az elméleti tányérmagasság értékek ábrázolását a lineáris áramlási sebesség függvényében (van Deemter (1) egyenlet)) a 13.a. és a 13.b. ábrán mutatom be a főkomponensre 100, 125 és 150°C hőmérsékleteken.



13.a. ábra A Levonorgestrel elméleti tányérmagassága (H) a lineáris áramlási sebesség (u) függvényében különböző hőmérsékleteken

Körülmények: áramlási sebesség: 0,5–3,2 ml/perc, mozgófázis: **60% (v/v) metanol** vízben, egyéb paraméterek a 9. ábrán



13.b. ábra A Levonorgestrel elméleti tányérmagassága (H) a lineáris áramlási sebesség (u) függvényében különböző hőmérsékleteken

Körülmények: áramlási sebesség: 0,5–3,5 ml/perc, mozgófázis: **49% (v/v) acetonitril** vízben, egyéb paraméterek a 9. ábrán

A hőmérséklet emelésével szignifikánsan csökken az elméleti tányérmagasság és a $H-u$ görbe minimum pontja a magasabb lineáris áramlási sebességek irányába tolódik el a metanolos mozgófázisban (13.a. ábra), míg az acetonitriles mozgófázisban (13.b. ábra) az elméleti tányérmagasság a hőmérséklet emelésével nem változik számottevően.

A mért adatokra, melyeket a pontok reprezentálnak, a van Deemter egyenletnek megfelelő görbét illesztettem. A hőmérséklet hatását az egyenlet A , B és a C együtthatóira számítottam és a C együtthatóra kapott eredményeket mindkét mozgófázisra az 5. táblázatban adom meg.

5. táblázat A hőmérséklet hatása a van Deemter egyenlet alapján számított C együtthatóra

t [°C]	$C [10^2 \text{s}^{-1}]$	
	metanol - víz	acetonitril - víz
100	0,48	0,34
125	0,30	0,33
150	0,23	0,35

Az 5. táblázatban bemutatott adatok alapján is megállapítható, hogy vizes metanolos mozgófázis esetén a C együttható egyértelműen csökken a hőmérséklet emelésével, míg a vizes acetonitriles mozgófázisban gyakorlatilag nem változik, vagyis ebben az acetonitriles összetételben mindhárom hőmérsékleten hatékony elválasztás érhető el. A C együttható csökkenését az (5) egyenlet értelmezése szerint főként az oldott anyag mozgófázisbeli diffúziós együtthatója okozza, amely elősegíti a gyorsabb és hatékonyabb elválasztást.

A további vizsgálatokhoz mindkét mozgófázisban a 150°C hőmérsékletet választottam.

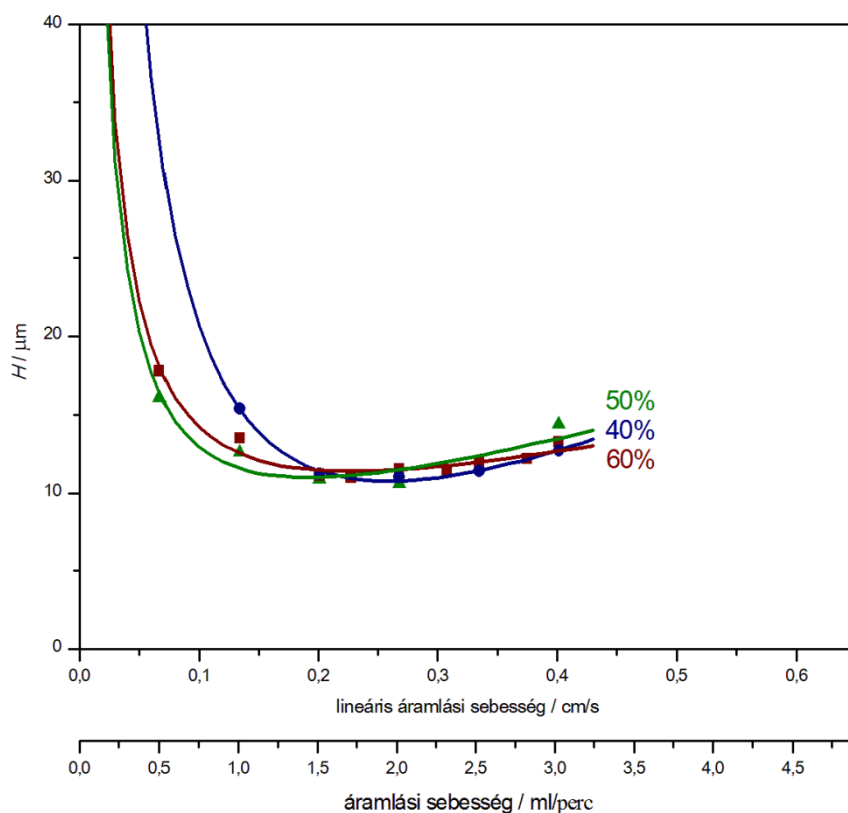
6.1.3. A mozgófázis szerves összetevőjének szerepe

Ha az eluens erősséget változtatjuk izokratikus körülmények között, akkor a vizsgált komponens retenciójára a következő összefüggést írhatjuk fel:

$$\log k = \log k_w - S\Phi \quad (48)$$

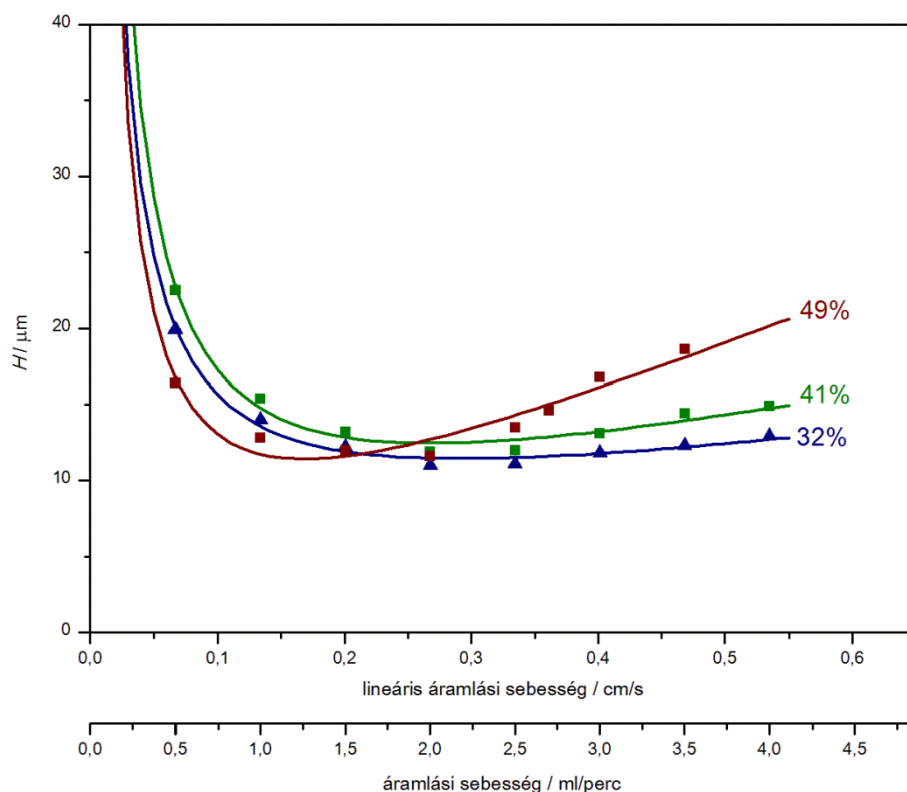
ahol k visszatartási tényező, k_w a 0% szerves oldószerre extrapolált visszatartási tényező, S az oldószerre jellemző állandó és Φ a fázisarány. A (48) egyenletből látható, hogy a szerves komponens csökkenésével a retenció nő.

A van Deemter összefüggést vizsgáltam különböző arányú szerves (metanol és acetonitril) összetevőt tartalmazó eluensekben, különböző áramlási sebességek alkalmazásával. Az acetonitriles mozgófázis szerves-vizes arányát a metanol-víz aránynak (40, 50 és 60% (v/v)) megfelelően az oldószererősség alapján számítottam át a (47) egyenlet szerint, majd a kerekítések után 32, 41 és 49% (v/v) acetonitril-víz mozgófázist használtam. A kapott adatokból a van Deemter egyenletnek megfelelően a 14.a. és 14.b. ábrákon bemutatott görbéket kaptam.



14.a. ábra A Levonorgestrel elméleti tányérmagassága (H) a lineáris áramlási sebesség (u) függvényében különböző metanol-víz aránynál

Körülmények: áramlási sebesség: 0,5–3,0 ml/perc, hőmérséklet: 150°C; egyéb paraméterek a 9. ábrán



14.b. ábra A Levonorgestrel elméleti tányérmagassága (H) a lineáris áramlási sebesség (u) függvényében különböző **acetonitril**–víz aránynál

Körülmények: áramlási sebesség: 0,5–4,0 ml/perc, hőmérséklet: 150°C; egyéb paraméterek a 9. ábrán

A különböző metanol koncentrációhoz tartozó van Deemter görbéknél nincs szignifikáns különbség (14.a. ábra), a C együttható értéke csökken (6. táblázat), ami a retenció csökkenéséből adódik, így a további kísérletekhez a 150°C hőmérséklet, 60% (v/v) metanol tartalmat választottam a gyors analízis eléréséhez.

6. táblázat A szerves oldószer hatása a van Deemter egyenlet alapján számított C együtthatóra

metanol % (v/v)	$C [10^2 \text{ s}^{-1}]$	acetonitril % (v/v)	$C [10^2 \text{ s}^{-1}]$
40	0,39	32	0,13
50	0,23	41	0,15
60	0,17	49	0,29

Az acetonitriles mozgófázisban a 32% és a 41% (v/v) acetonitril szerves oldószerben végzett kísérleteknél nincs számottevő különbség (14.b. ábra), a C együttható értéke sem változik jelentősen, azonban a 49% (v/v) acetonitrilben nagymértékben megnő az értéke (6. táblázat). A C együttható növekedése az (5) egyenlet szerint az oldott anyag diffúziós

együttható csökkenésére utal a mozgófázisban, ami a (6) egyenlet értelmében fordítottan arányos a viszkozitással. Tekintettel arra, hogy különböző hőmérsékleteken, különböző szerves összetételű (metanol és acetonitril) elegyek viszkozitási adatai nem álltak rendelkezésünkre, ezért a jelenség okának tisztázására további kísérleteket nem végeztünk. A további lépésekhez a 150°C hőmérsékletet és a 41% (v/v) acetonitrilt tartalmazó szerves mozgófázist választottam.

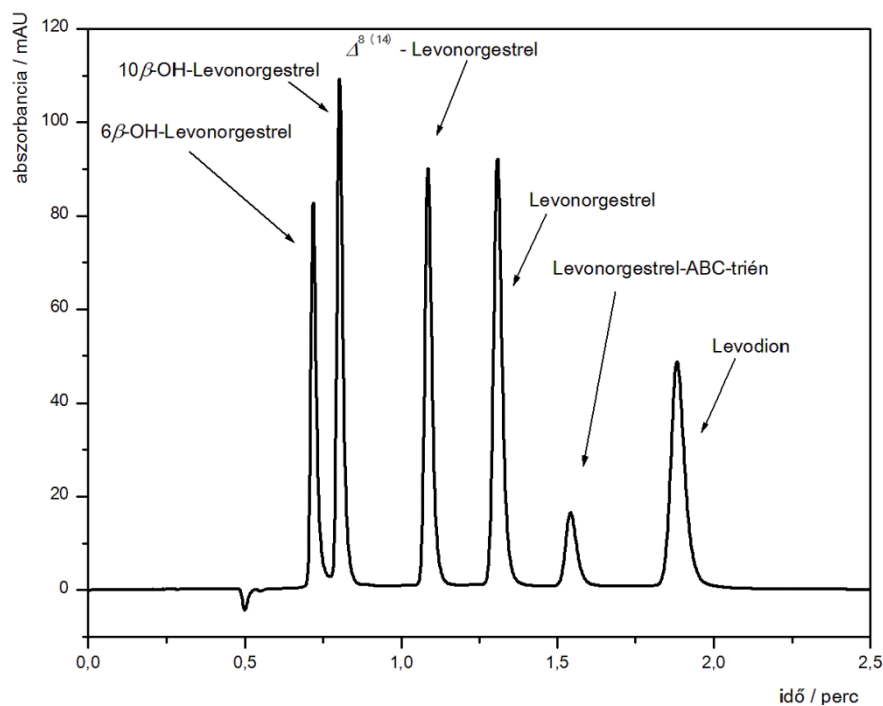
6.1.4. Az áramlási sebesség vizsgálata

Az optimális áramlási sebességet ott érjük el, ahol a $H-u$ görbének minimum pontja van, vagyis a van Deemter egyenlet lineáris áramlási sebesség szerinti deriváltja nulla, azaz:

$$dH/du = 0 \quad (49)$$

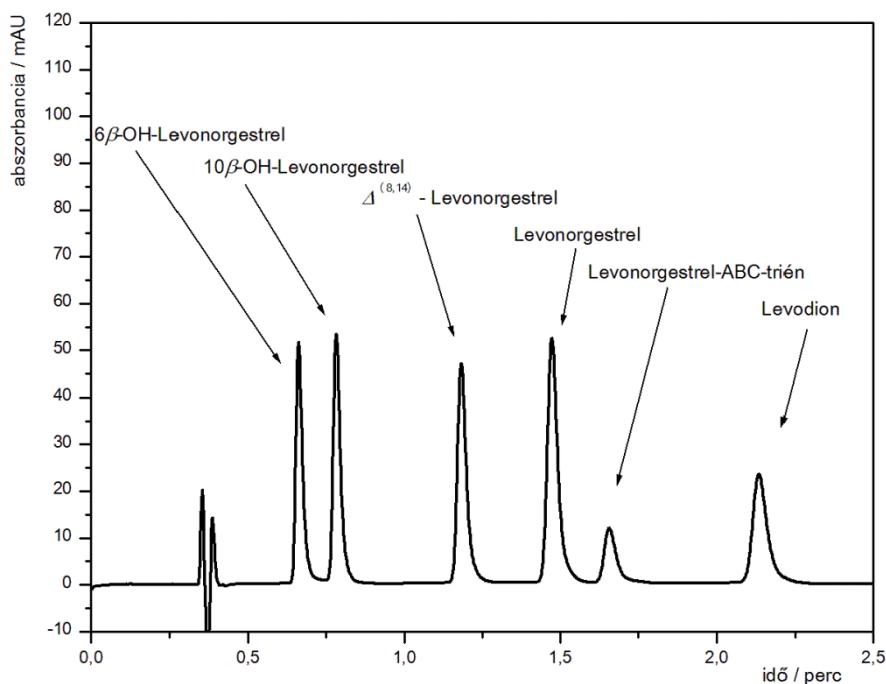
$$dH/du = D_M/d_p (B/C)^{1/2} \quad (50)$$

Az előző fejezetben tárgyaltak alapján a vizsgált tartományban a tányérmagasság nem változik jelentősen az áramlási sebesség növelésével (14.a, 14.b). Az elválasztás szemléltetésére így mindkét kísérletsorozatból a legnagyobb áramlási sebességnél kapott kromatogramokat mutatom be (15.a. és 15.b. ábrák), ahol teljesül: a csúcsfelbontás nagyobb 1,5 minden csúcspár között.



15.a. ábra A Levonorgestrel és szennyezései hatékony és gyors elválasztása **metanolban**.

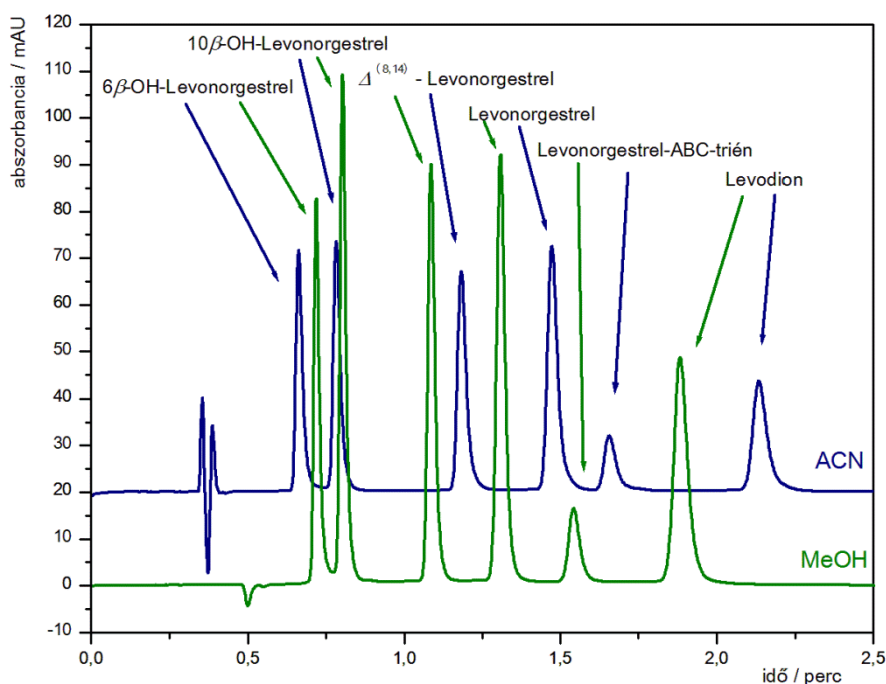
Körülmények: áramlási sebesség: 3,0 ml/perc, hőmérséklet: 150°C, mozgófázis: 60% (v/v) vizes metanol, egyéb paraméterek a 9. ábrán.



15.b. ábra A Levonorgestrel és szennyezései hatékony és gyors elválasztása **acetonitrilben**.

Körülmények: áramlási sebesség: 4,0 ml/perc, hőmérséklet: 150°C, mozgófázis: 41% (v/v) vizes acetonitril, egyéb paraméterek a 9. ábrán.

A bemutatott két leggyorsabb rendszerben a további áramlási sebesség növelésének a kolonnán kialakult nyomásesés szabott határt.



16. ábra A gyors elválasztás mindkét rendszerben
Körülmények a 15.a. és b. ábrán

7. táblázat Jellemző kromatográfiás adatok

Komponens neve	60% (v/v) metanol		41% (v/v) acetonitril	
	k	R_s^*	k	R_s^*
6 β -OH-Levonorgestrel	0,44	-	0,66	-
10 β -OH-Levonorgestrel	0,61	2,5	1,22	2,9
$\Delta^{8(14)}$ -Levonorgestrel	1,18	7,3	2,35	8,5
Levonorgestrel	1,62	4,7	3,17	5,2
Levonorgestrel-ABC-triën	2,09	3,9	3,69	2,8
Levodion	2,77	4,5	5,05	6,2

*A megadott csúcsfelbontás értéke (R_s) az adott komponens és az előtte eluálódó komponensre vonatkozik.

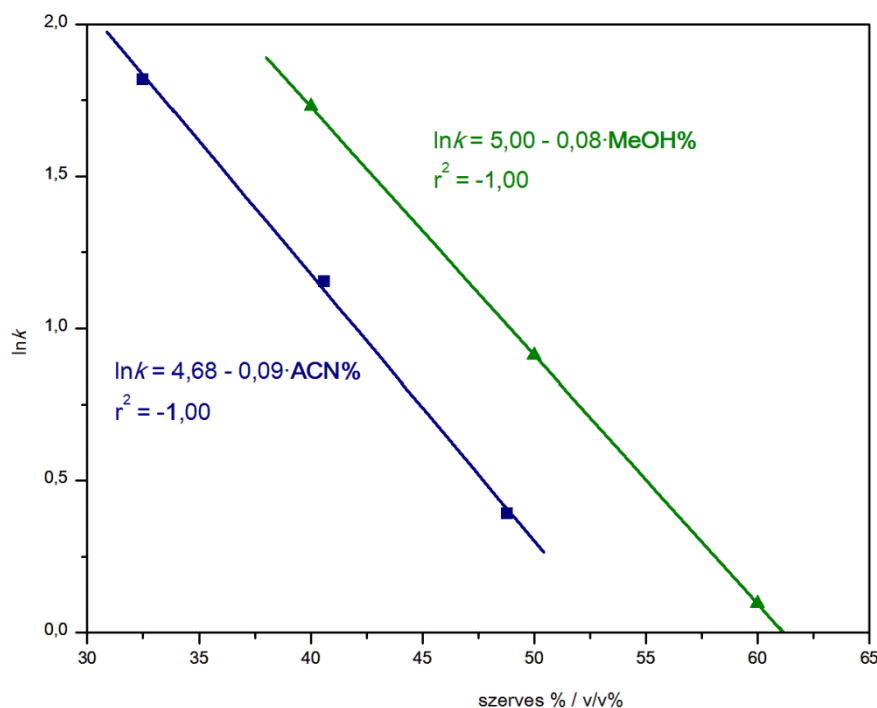
A kapott kromatogramok és a 7. táblázatban szereplő, jellemző kromatográfiás adatok alapján megállapítható, hogy mindkét eluens összetételben igen rövid analízis idővel (max. 2,5 perc) tudtam elválasztani a Levonorgestrelt és 5 kiválasztott szennyezőjét. A kromatogramok és a kapott adatok is mutatják, hogy a metanol és az acetonitril még azonos erősségre való átszámolás esetén is másképpen viselkedik. Ennek nyilvánvaló oka eltérő szelektivitásukban és a különböző szerkezeti- és kémiai tulajdonsággal rendelkező vegyületekkel és az állófázissal kialakult kapcsolatukban keresendő. Ugyanakkor az is megállapítható, hogy a két

rendszer egymással helyettesíthető, mindkettő alkalmas rutin vizsgálatokra történő továbbfejlesztésre.

6.1.5. A retenciós idő előrejelzése

Az elvégzett kísérletekből kapott adatokra illesztett görbék segítségével a Levonorgestrel retenciós ideje előre jelezhető mind az acetonitril–víz, mind a metanol–víz mozgófázisban más eluens összetételénél is.

A visszatartási tényező természetes alapú logaritmusát ábrázolva a szerves komponens térfogat %-a függvényében, az adott hőmérsékleten és áramlási sebességnél mindkét mozgófázisban lineáris összefüggést kaptunk (17. ábra). A kapott egyenletekből előre számítható a várt retenciós idő a különböző szerves-vizes arány esetén.



17. ábra Az $\ln k$ – szerves% összefüggés Levonorgestrelre

Körülmények: áramlási sebesség metanolban (▲) 3 ml/perc, acetonitrilben (■) 4 ml/perc; hőmérséklet 150°C, egyéb paraméter a 9. ábrán

6.1.6. Eredmények, következtetések

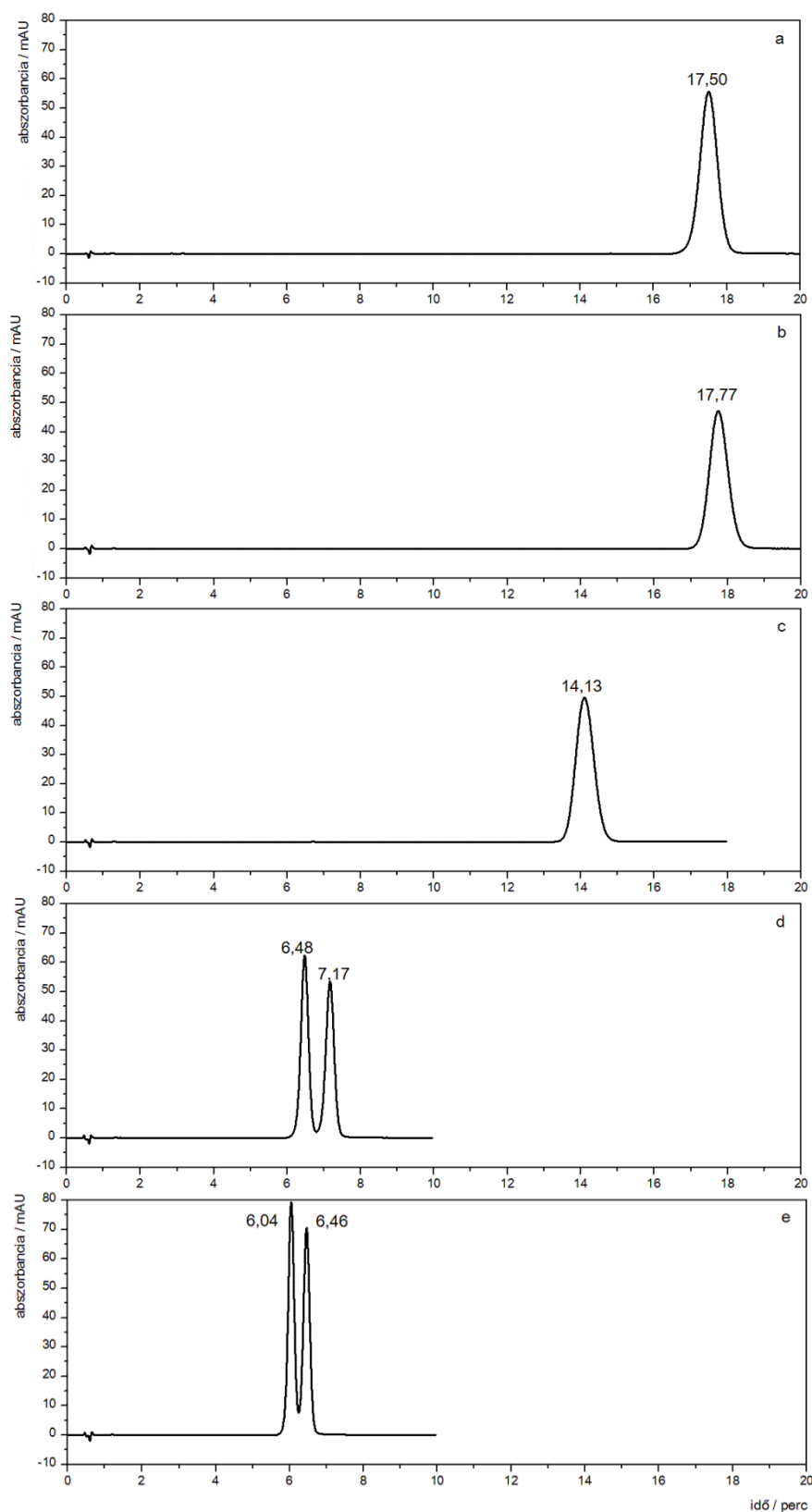
Korábban már említettem, és az elvégzett kísérletek során kapott eredmények is bizonyítják, hogy a gyors kromatográfiának, különös tekintettel az emelt hőmérsékletű elválasztásoknak igen nagy jövője lehet a gyógyszerkutatásban, gyógyszerkészítmények ellenőrzésére alkalmazott rutin vizsgálatokban. A Levonorgestrel hatóanyag és szennyezéseinek elválasztására emelt hőmérsékleten gyors és nagy áteresztőképességű rendszert dolgoztam ki korszerű, cirkónium-dioxid alapú állófázison a kromatográfiás körülmények (hőmérséklet, szerves komponens minősége és mennyisége, áramlási sebesség) változtatásával. Megállapítottam, hogy a folyadékkromatográfiás elméleti összefüggések (van Deemter, van't Hoff egyenlet) kiterjesztett (50–150°C) hőmérséklet-tartományban érvényesek. A 16. ábrán bemutatott kromatogramok jól szemléltetik, hogy 2,0–2,5 perc analízis idő alatt elválaszthatók egymástól a Levonorgestrel és 5 szennyezése, ezért a kidolgozott módszert alkalmazni lehet a jövőben Levonorgestrel hatóanyag tisztaságvizsgálatára és gyógyszerkészítményekben történő szelektív és gyors hatóanyag-tartalom mérésére is.

6.2. A Norgestrel enantiomerek és a natív ciklodextrinek

A korábbi irodalmi tapasztalatokat figyelembe véve, korszerű oszlopon és kiterjesztett hőmérséklet-tartományban vizsgáltam a Norgestrel hatóanyag királis enantiomerjeinek elválasztási lehetőségét. NMR vizsgálatokkal kerestük a magyarázatot arra, hogy az α - és a β -CD szelektorok miért nem hatásosak az enantiomerek elválasztására szélesebb hőmérséklet-tartományban sem, míg a γ -CD üreg mérete már megfelelő a komplex kialakulásához és a királis megkülönböztetés létrejöttéhez. Különböző hőmérsékleten NMR vizsgálatokat végeztünk a termodinamikai szelektivitás független mérésére, és a létrejött komplexek szerkezetének tanulmányozására.

6.2.1. HPLC kísérletek natív ciklodextrinekkel

A kísérletek tervezésénél Gazdag Mária és munkatársai [141], valamint Lamparczyk és munkatársai eredményeiből indultam ki [139], ezért szerves oldószerként metanolt, 5 mM bemérési koncentrációjú natív ciklodextrinek és kiterjesztett hőmérséklet-tartományt (10–50°C) alkalmaztam. Az eredmények megadásánál a pontos ciklodextrin koncentráció számításához figyelembe vettem a ciklodextrinek Karl Fischer titrálással mért víztartalmát és a metanol-víz (1:1, v/v) elegy térfogati kontrakcióját 25°C-on (0,9644) [156]. A szelektor kiválasztása során alkalmazott natív ciklodextrinek eltérő koncentrációja az eltérő víztartalomból adódik.



18. ábra Racém Norgestrel elválasztása (a) királis szelektor nélkül, (b) 4,3 mM α -CD, (c) 4,2 mM β -CD, (d) 4,5 mM γ -CD, (a – d) 25°C-on és (e) 4,5 mM γ -CD 50°C-on.

Körülmények: oszlop: Luna C₁₈ (2) (50 x 3 mm, 3 μ m); mozgófázis: 50% (v/v) MeOH vízben; áramlási sebesség: 0,5 ml/perc; injektált térfogat: 3 μ l a 0,1 mg/ml koncentrációjú racém Norgestrel oldatból; detektálás: 244 nm hullámhosszon.

Elúciós sorrend: *d*-Norgestrel, *l*-Norgestrel; a retenciós időket (percben) a csúcsokon tüntettem fel.

Irodalmi adatok és saját méréseim alapján azt tapasztaltam, hogy a racém Norgestrel natív ciklodextrinekkal történő elválasztásakor az α -CD gyakorlatilag nem változtatja meg a racém Norgestrel retenciós idejét, míg a β -CD alkalmazásával a retenciós idő jelentősen csökkent a királis szelektor nélküli rendszerhez képest (18.b. és c. ábra) [141]. Királis felismerést egyik esetben sem tapasztaltam, vagyis vagy nem alakult ki zárványkomplex, vagy csak nagyon kis stabilitású. A γ -CD-vel, metanol-víz tartalmú mozgófázisban alapvonal elválasztás érhető el a Norgestrel enantiomerekre (18.d. ábra) [141], tehát a γ -CD üreg mérete megfelelő a komplex kialakulásához és a királis megkülönböztetés létrejöttéhez, mely általánosságban elmondható a szteroidok elválasztására [141,153].

6.2.1.1. A hőmérsékletváltozás tanulmányozása γ -CD szelektorrall

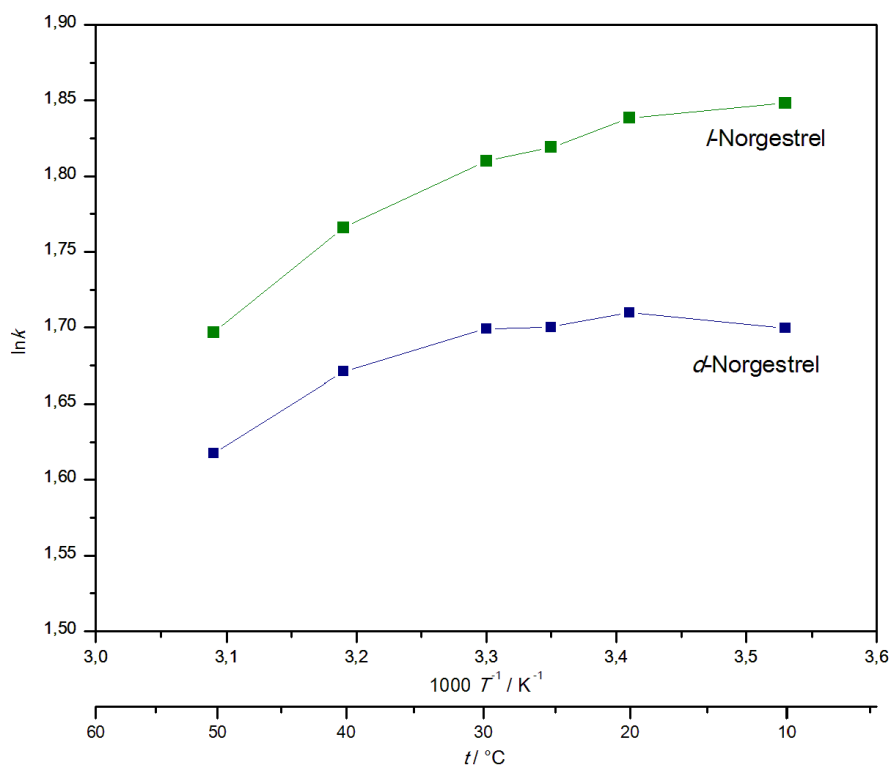
A megfelelő szelektor kiválasztása után vizsgáltam a hőmérséklet hatását 10–50°C tartományban, valamint kromatográfiás és termodinamikai összefüggéseket számítottam.

8. táblázat A t_d (*d*-Norgestrel), t_l (*l*-Norgestrel) retenciós idők, α szelektivitás, R_s csúcsfelbontás értékek
Körülmények: mozgófázis: metanol-víz (1:1, v/v) 4,5 mM γ -CD, hőmérséklet: 10–50°C. Egyéb paraméterek a 18. ábrán

$t / ^\circ\text{C}$	t_d / perc	t_l / perc	α	R_s
10	$6,5 \pm 0,1^*$	$7,3 \pm 0,1$	1,16	1,86
20	$6,5 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,1$	1,14	1,78
25	$6,5 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$	1,13	1,69
30	$6,5 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$	1,12	1,67
40	$6,3 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,1$	1,10	1,54
50	$6,0 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,1$	1,08	1,32

* \pm jel után a hibahatárt adtam meg standard deviáció legkisebb négyzetek módszerével

Megállapíthatjuk, hogy a hőmérséklet emelésével az analízis idő és a szelektivitás értéke kismértékben csökken (18.e. ábra), a csúcsfelbontás értéke 40°C felett már (8. táblázat) nem éri el az alapvonal elválasztáshoz szükséges értéket (min. 1,5). A retenciós adatokból visszatartási tényezőt számítottam, melyhez a holtidőt 10 $\mu\text{g/ml}$ NaNO_3 oldat injektálásával határoztam meg [137].



19. ábra Az $\ln k - 1/T$ összefüggés az *l*- és a *d*-Norgestrelre

Körülmények: mozgófázis: metanol-víz (1:1, v/v) 4,5 mM γ -CD, egyéb paraméterek a 18. ábrán

A visszatartási tényező hőmérsékletfüggése nemlineáris görbét eredményezett (19. ábra), ahogy Zarziczky és munkatársai is tapasztalták különböző szteroidokra [134,138]. A van't Hoff összefüggés egyenestől való eltérését okozhatja az elválasztandó komponens és az eluens szerves komponensének versengése a hidrofób üreg kötőhelyeiért [128]. A hőmérséklet emelésével megnő az adszorpció/deszorpció sebessége, mindkét versengő molekula kinetikája felgyorsul.

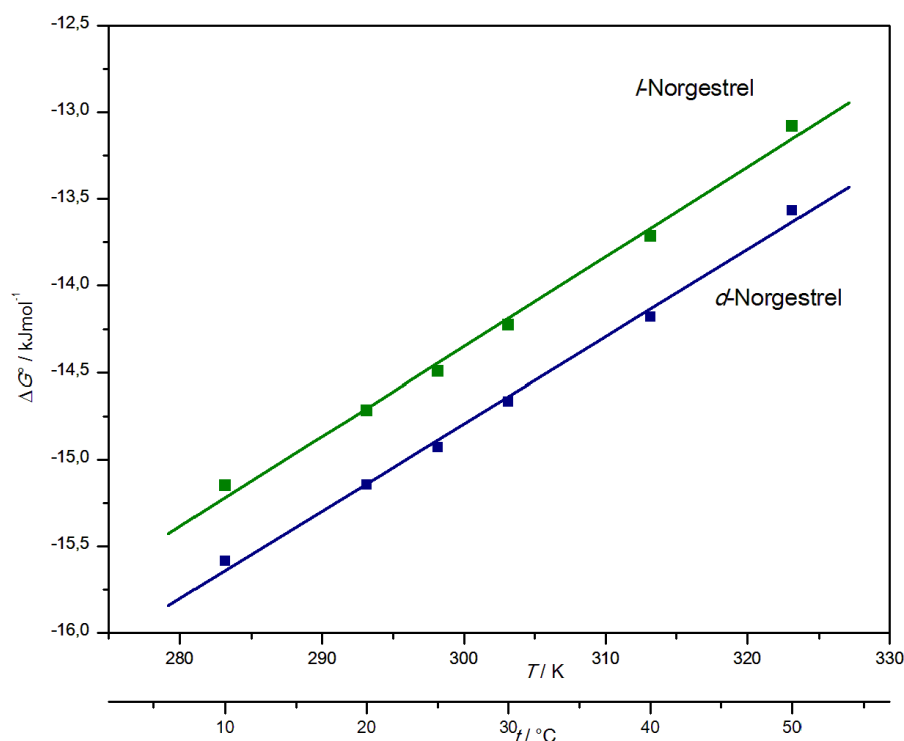
A mért retenciós adatokból a (43) egyenlet alapján a K_d és K_l stabilitási állandókat, valamint királis szelektivitás értékeket, $\alpha_c = K_d K_l^{-1}$ számítottam (9. táblázat).

9. táblázat A stabilitási állandó- (K_d , K_l), és királis szelektivitás értékek (α_c) a d - és az l -Norgestrelre. Körülmények a 18. ábrán

t (°C)	K_d (M ⁻¹)	K_l (M ⁻¹)	α_c
10	750 ± 2	624 ± 2	1,20 ± 0,04*
20	500 ± 3	419 ± 4	1,19 ± 0,04
25	412 ± 4	346 ± 5	1,19 ± 0,04
30	337 ± 5	283 ± 6	1,19 ± 0,05
40	232 ± 9	194 ± 10	1,20 ± 0,06
50	156 ± 16	130 ± 20	1,21 ± 0,08

* ± jel után a hibahatárt adtuk meg standard deviáció legkisebb négyzetek módszerével

Az adatokból jól látható, hogy a királis szelektivitás értékek hibahatáron belül szinte változatlanok az alkalmazott hőmérséklet-tartományban, míg a hőmérséklet emelésével a stabilitási állandók értéke csökken. A kötődési állandót átszámítottam a Gibbs-féle szabadenergia értéké a $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ egyenlet alapján, majd a kapott ΔG° értékeket ábrázoltam a T függvényében (20. ábra).



20. ábra A Gibbs féle szabadenergia értékek a hőmérséklet függvényében

Az illesztett egyenesek egyenleteiből a termodinamikai jellemzők megadhatók (10. táblázat).

10. táblázat Norgestrel enantiomerek γ -CD komplexeinek termodinamikai jellemzői

	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	r^2 (n)
<i>d</i> -Norgestrel	-29,9 ± 0,5	-50,2 ± 1,7	0,998 (6)
<i>l</i> -Norgestrel	-29,9 ± 0,6	-51,7 ± 2,0	0,997 (6)
Δ (<i>d</i> – <i>l</i>)	0,0 ± 0,6	1,5 ± 2	-

r^2 korrelációs koefficiens négyzet, *n* a pontok száma
± jel után a legkisebb négyzetek módszerével számított hiba

Az r^2 értékek szerint $\Delta G^\circ - T$ függvény mindkét enantiomerre lineáris összefüggést mutat, amely bizonyítja a komplexképződés standard hőkapacitás-változásának állandóságát az adott hőmérséklet-tartományban.

A Norgestrel/ γ -CD komplex kialakulásának hajtóereje lényegében entalpiikus, azonban a negatív ΔS° értékek rendezettség növekedésre utalnak az asszociáció során. Hasonló nagyságú termodinamikai paramétereket közöltek ösztradiol-származékok γ -CD komplexeire Sosnowska és munkatársai is [106].

Az egyensúlyi állandók hányadosa – a királis szelektivitás (α_c) – a Gibbs egyenlet felhasználásával a termodinamikai mennyiségek különbségét adja:

$$\Delta(\Delta G^\circ) = -RT \ln \frac{K_d}{K_l} = -RT \ln \alpha_c = \Delta(\Delta H^\circ) - T\Delta(\Delta S^\circ) \quad (50)$$

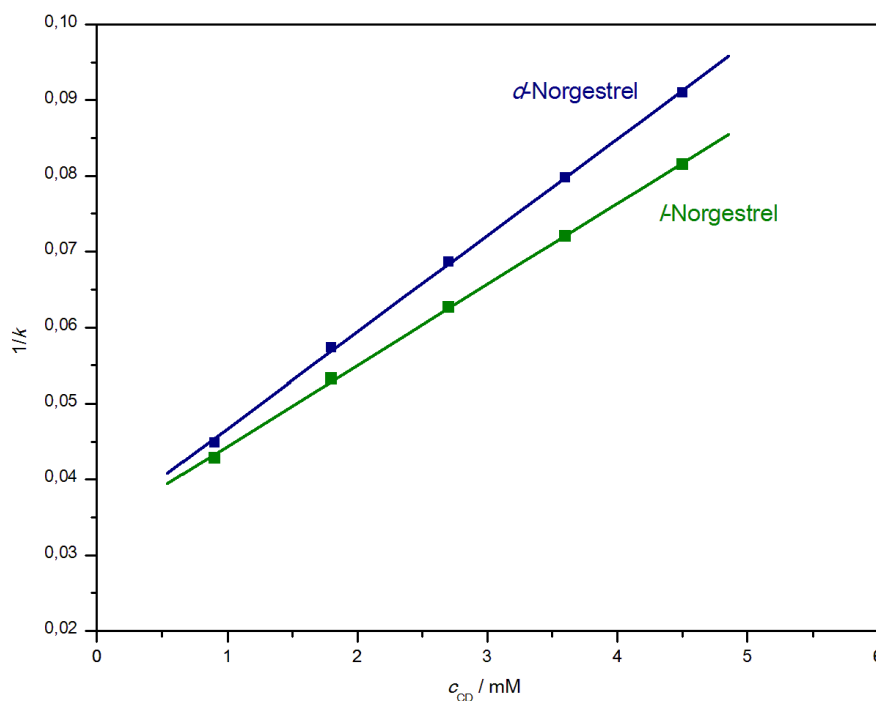
A $\Delta(\Delta H^\circ)$ és a $\Delta(\Delta S^\circ)$ értékek (10. táblázat utolsó sora) nem térnek el jelentős mértékben a nullától, mely azt mutatja, hogy a hőmérséklet csekély befolyással van a Norgestrel/ γ -CD komplexek stabilitására.

6.2.1.2. A mozgófázis ciklodextrin és metanol tartalmának hatása az elválasztásra

A királis szelektor koncentrációjának növelésével (0,9–4,5 mM) a retenció idő csökkent, míg a csúcsfelbontás értéke (R_s) nőtt (11. táblázat). Ye és munkatársai hidroxipropil- β -CD szelektor alkalmazásával is hasonló tapasztaltak a Norgestrel enantiomerek C_8 állófázison történő elválasztásakor [153]. A komplex sztöchiometriai összetételére kaphatunk információt, ha a (41) és a (42) egyenletek értelmében a CD koncentráció függvényében ábrázoljuk a visszatartási tényező reciprokját (21. ábra).

11. táblázat Különböző γ -CD koncentrációknál kapott csúcsfelbontás (R_s) értékek

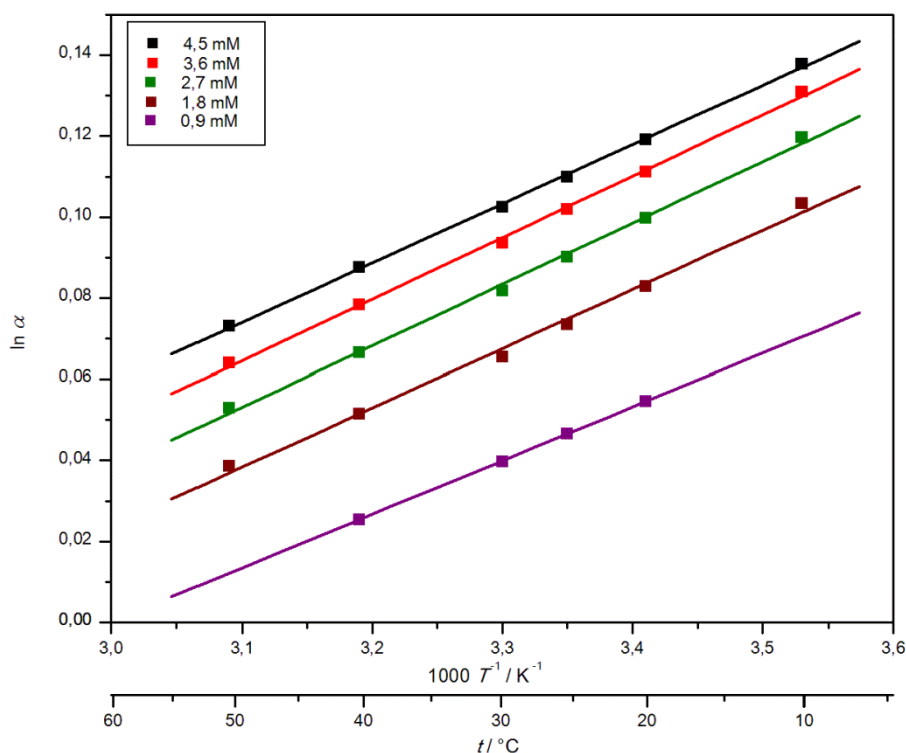
c_{CD} / mM	R_s
4,5	1,65
3,6	1,60
2,7	1,45
1,8	1,23
0,9	0,75



21. ábra A visszatartási tényező (k) reciproka a CD koncentráció (c_{CD}) függvényében
Körülmények: a 18. ábrán

A CD koncentráció és a visszatartási tényező reciproka közötti lineáris összefüggés 1:1 komplex kialakulására utal, melyet az NMR vizsgálataink is alátámasztanak (6.2.2.3. fejezet).

A szelektivitás (α) logaritmusa a hőmérséklet reciproka függvényében (T^{-1}) nagyon jó illeszkedéssel ($r^2 > 0,99$) egyenest eredményezett (22. ábra), az illesztett egyenesek paramétereit a 12. táblázatban foglaltam össze.



22. ábra Az $\ln \alpha - 1/T$ függvények különböző γ -CD koncentrációban
Körülmények a 18. ábrán

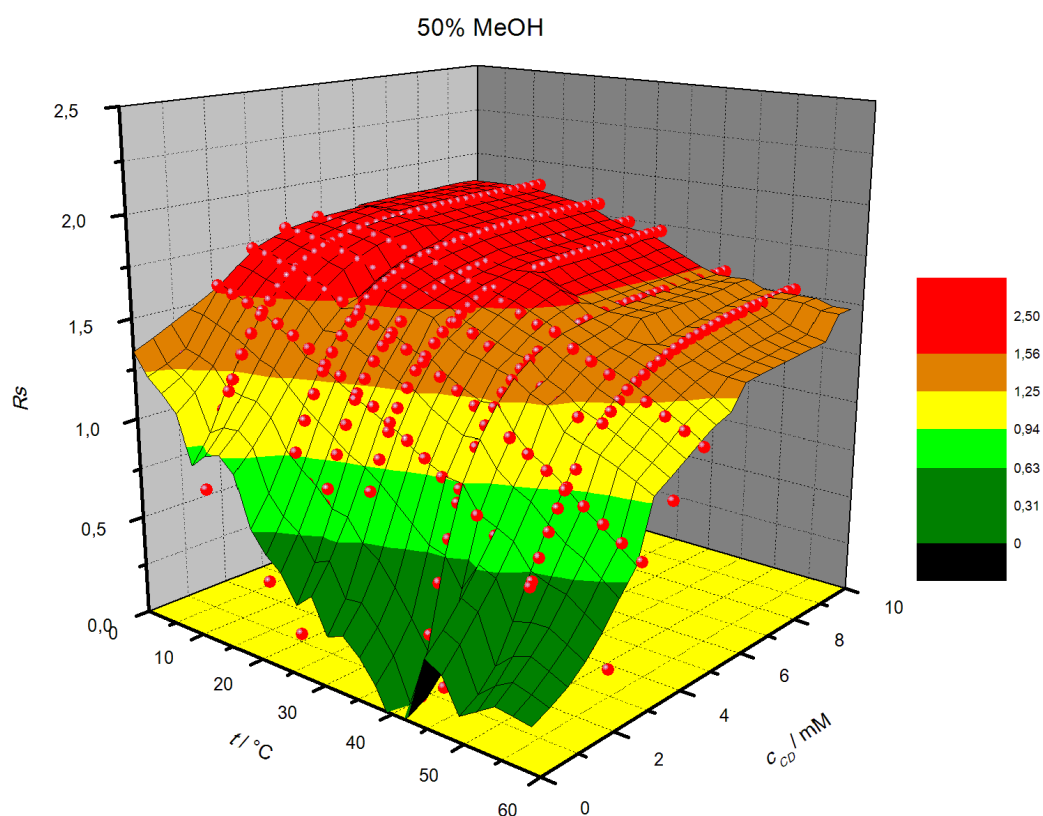
12. táblázat $\ln \alpha - 1/T$ adatsorokra illesztett egyenesek egyenletei: $\ln \alpha = A + B \cdot 1000T^{-1}$ és a hibaérték

$c_{\text{CD}} / \text{mM}$	A	B	$r^2 (n)$
4,5	-0,380	0,146	1,00 (6)
3,6	-0,406	0,152	1,00 (6)
2,7	-0,417	0,152	1,00 (6)
1,8	-0,415	0,146	1,00 (6)
0,9	-0,398	0,133	1,00 (4)

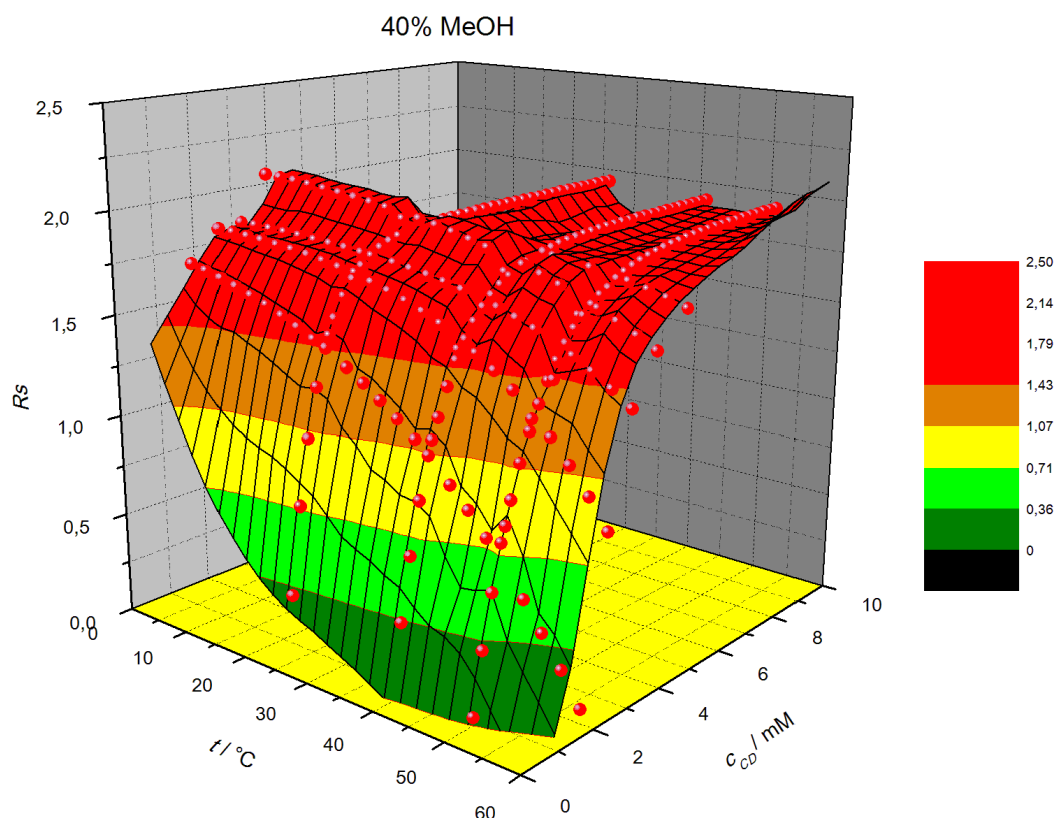
r^2 korrelációs koefficiens négyzet, n a pontok száma
± jel után a legkisebb négyzetek módszerével számított hiba

A legnagyobb szelektivitás az általam alkalmazott koncentrációtartományban 4,5 mM γ -CD koncentrációban érhető el (l. 22. ábra).

A mozgófázis szerves komponensének az arányát (40–60% (v/v)) is változtattam. A 60% (v/v) MeOH tartalom az enantiomerek két csúcsban történő elúcióját eredményezte, azonban nem tapasztaltam alapvonal elválasztást az alkalmazott hőmérséklet-tartományban. A 40% és 50% (v/v) szerves tartalmú eluensben kapott 3D felületeket a 23. ábrákon mutatom be. A 40% (v/v) MeOH tartalmú mozgófázisban szélesebb tartományban változtatható a királis szelektor koncentrációja és a hőmérséklet az alapvonalon történő elválasztás eléréséhez. Az ábrákon az $R_s \geq 1,5$ értéknél nagyobb csúcsfelbontásokat pirossal jelöltem.

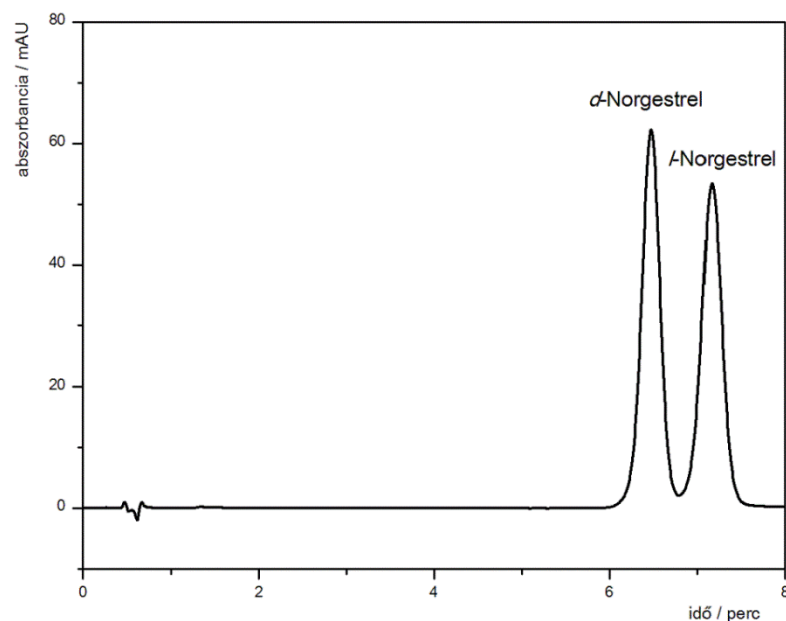


23.a. ábra A csúcsfelbontás (R_s) ábrázolása a hőmérséklet (t) és a ciklodextrin koncentráció (c_{CD}) függvényében. Körülmények: mozgófázis: 50% (v/v) MeOH és különböző koncentrációjú γ -ciklodextrin, egyéb paraméterek a 18. ábrán



23.b. ábra A csúcsfelbontás (R_s) ábrázolása a hőmérséklet (t) és a ciklodextrin koncentráció (c_{CD}) függvényében. Körülmények: mozgófázis: 40% (v/v) MeOH és különböző koncentrációjú γ -ciklodextrin, egyéb paraméterek a 18. ábrán

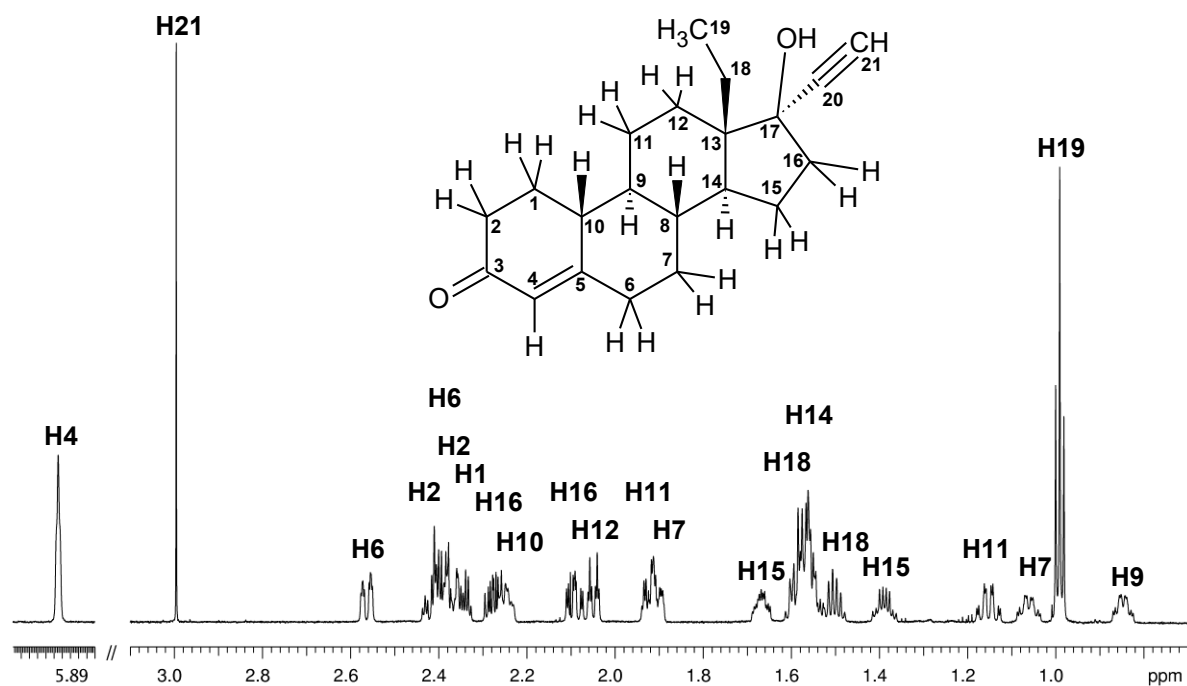
A legjobb elválasztást 50% (v/v) MeOH, 4,5 mM γ -CD eluenssel 25°C hőmérsékleten értem el a Luna C₁₈ állófázison (24. ábra).



24. ábra A racém Norgestrel elválasztása. Körülmények: mozgófázis: 4,5 mM γ -CD, 50% (v/v) MeOH vízben, hőmérséklet: 25°C, egyéb paraméterek a 18. ábrán; 1. *d*-Norgestrel, 2. *l*-Norgestrel; $R_{s,1,2} = 1,65$

6.2.2. A natív CD-kel képzett komplexek NMR vizsgálatai

Az NMR vizsgálatokat a Norgestrel ^1H NMR spektrumának jelhozzárendelésével kezdtük 1:1 térfogatarányú $\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$, illetve $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$ oldószerkeverégekben.



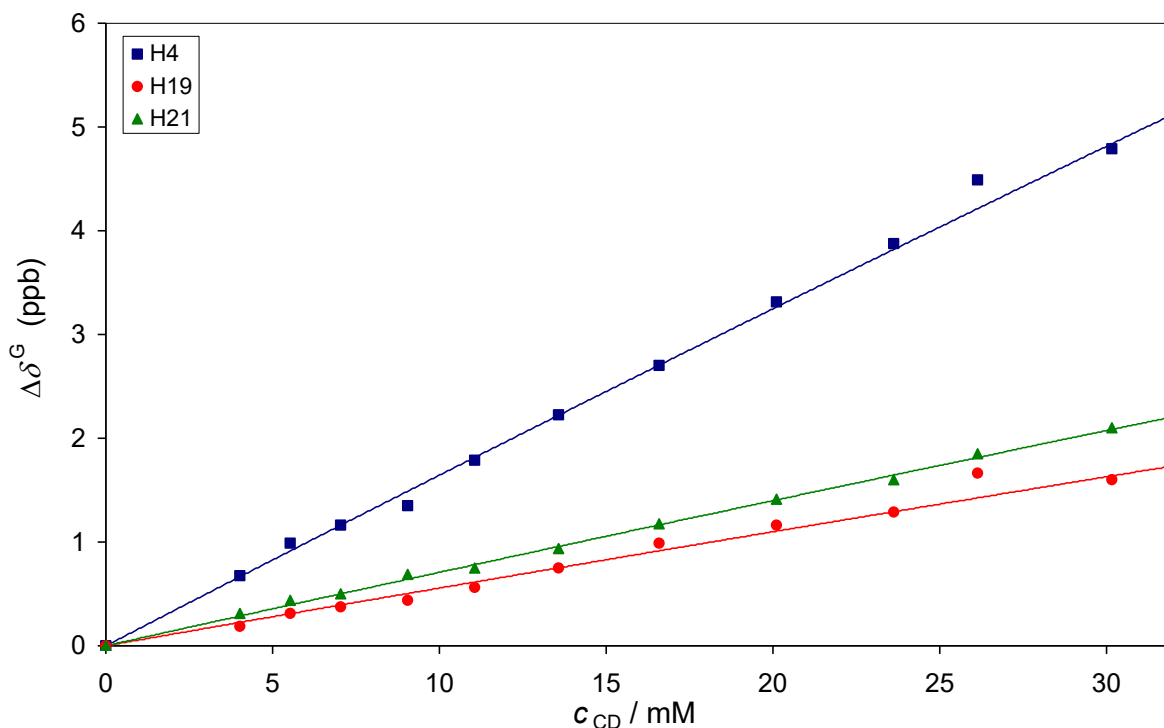
25. ábra 0,5 mM *d*-Norgestrel 800 MHz-es ^1H NMR spektruma és jelhozzárendelése $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ 1:1 v/v oldószerben, 25°C -on

A *d*-Norgestrel NMR spektrumából (25. ábra) a jól elkülönülő H4 olefinproton, a H21 acetilénproton, valamint a H19 metilproton kémiai eltolódása olvasható le a legegyszerűbben. Ezek a spinek a molekula különböző molekularészletein képesek „érzékelni” a kémiai környezet változását a ciklodextrin hatására, ezért választotta őket már Tárkányi Gábor is „indikátormagoknak” a titrálásokhoz [84]. A jelen doktori munka során ezen magok $\Delta\delta^{G,i}$ kémiai eltolódás-változását mindegyik CD-vel való kölcsönhatás során regisztráltuk, a nagyobb jeldiszperziót biztosító 800 MHz-es titrálások egy részében azonban további magokat is „bevontunk” az analízisbe, ilyenek voltak például mindkét H16, vagy az 1,2 ppm alatt jelet adó H11, H7 és H9. Egyes különálló jelcsoport olyan összetett multiplettet adott már CD nélkül is (pl. 1,67 ppm körül H15) vagy a CD hatására megkettőződése után (pl. H6 2,56 ppm körül), hogy kémiai eltolódását ezért nem lehetett pontosan leolvasni. További, erősen átfedő multiplettek kémiai eltolódásainak meghatározására jóval időigényesebb további (zTOCSY, esetleg HSQC) spektrumokra lett volna szükséges minden egyes titrálási pontban.

6.2.2.1. α -CD hatása

A racém Norgestrel ^1H NMR titrálása során a H4 olefinproton kémiai eltolódása mindössze 5 ppb, a H21 acetilén- és a H19 metiljelé pedig < 2 ppb $\Delta\delta^G$ változást mutatott 30 mM α -CD hozzáadására. A 26. ábrán bemutatott titrálási görbék azt is demonstrálják, hogy a gondos oldatkészítés, valamint a 800 MHz-es spektrométer nagy jeldiszperziója még ilyen finom változások követését is lehetővé teszi, a δ_{H} meghatározásának kísérleti hibája kb. 0,2 ppb-re tehető (az irodalomban 400 MHz-re 0,5 ppb hibabecslést találunk [84]). Egyik ^1H jelen sem tapasztaltunk királis kettőződést. 2D NOESY és ROESY spektrumokat is mértünk egy 1 mM *d*-Norgestrel és 5 mM α -CD mintán, de nem kaptunk intermolekuláris NOE jeleket.

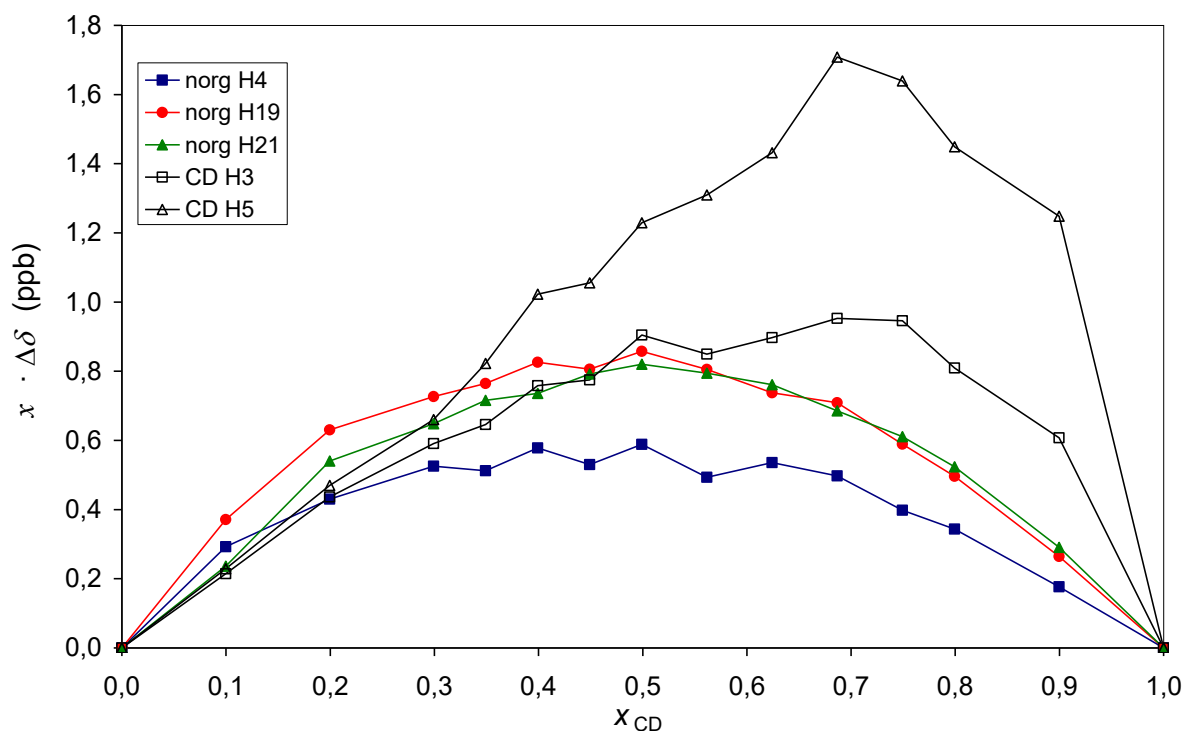
Mindezek a tapasztalatok igen kis stabilitású komplex képződésére utalnak, ami összhangban áll a HPLC-ben tapasztalt gyenge effektussal. Az NMR titrálási görbék illeszthetők ugyan az OPIUM programmal, de mivel nincs jelentős görbületük, az egyensúlyi állandóra csak közelítő becslés adható [84]: 1:1 sztöchiometriát feltételezve $K < 5$. Tárkányi Gábor 30 körüli egyensúlyi állandót mért $\text{CD}_3\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ 1:100 (v/v) közegben; általános tapasztalat, hogy az oldószer-polaritással párhuzamosan a CD-komplexek stabilitása is növekszik.



26. ábra Racém Norgestrel három protonjának 800 MHz-es NMR titrálási görbéi α -CD-vel 25°C-on

6.2.2.2. β -CD hatása

β -ciklodextrinnel először a képződő komplexek sztöchiometriáját vizsgáltuk Job módszere [87] szerint (27. ábra). A *d*-Norgestrel H4, H19 és H21 spinjeinek görbéi 0,5-ös móltörtnél mutatnak maximumot, ami 1:1 komplex domináns képződésére utal. Ennél a titrálásnál leolvastuk a CD belső üregében elhelyezkedő (4. ábra) H3 és H5 protonok kémiai eltolódását is, amelyek grafikonja viszont széles maximummal rendelkezik a CD 0,5 és 0,7-es móltörtje között (27. ábra). Ilyen lefutású Job ábra 2:1 és 1:1 komplexek szimultán fellépését valószínűsíti [77]. A β -CD üregébe egész szteroid molekulák általában nem férnek bele, ismeretes viszont olyan 2:1 komplex szerkezete, ahol az A és D gyűrű (illetve az utóbbinak az oldallánca) épül egy-egy ciklodextrin üregébe [111]. Biciklusos vendégmolekulák esetén is leírtak két CD-t tartalmazó komplexeket [157,97]. A Norgestrel esetén nekünk sikerült először valószínűsíteni a 2:1 arányú komplexek képződését β -CD-vel.

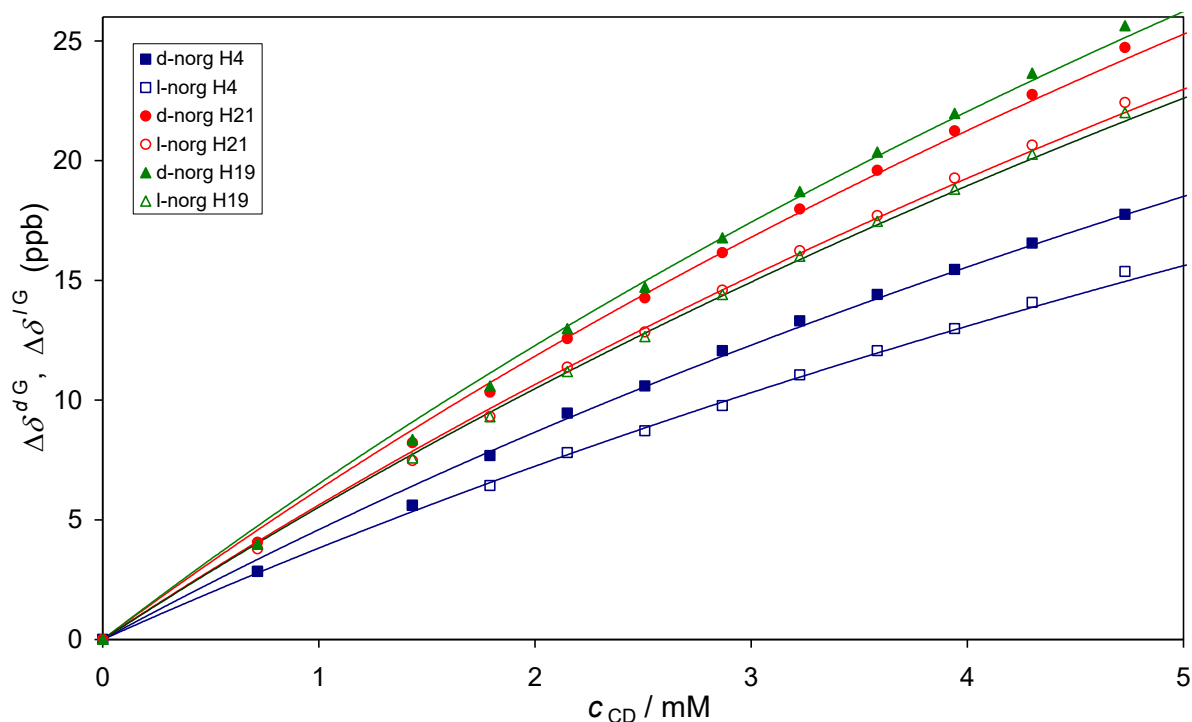


27. ábra A *d*-Norgestrel három és a β -CD két fajta protonjának Job görbéi 800 MHz-en és 25°C-on

A racém Norgestrel ^1H NMR titrálása során a szteroid mindhárom vizsgált jele kettőződést mutatott 2 mM-nál nagyobb CD-koncentrációknál (28. ábra). 5 mM β -CD hozzáadására a H19 metil-, H4 olefin- és H21 acetilénprotonokra rendre 3,7; 2,4 és 2,3 ppb $\Delta\Delta\delta^G$ értékeket mértünk. A β -CD korlátozott oldhatósága miatt nem volt lehetőség a teljes

komplekképzésnek megfelelő „plató” elérésére, ezért (az α -CD-hez hasonlóan) csak közelítő kiértékelést tudtunk végezni az OPIUM programmal. Csak 1:1-es komplex feltételezésével 25°C-on $K_d = 67 \pm 4$ és $K_l = 62 \pm 5$ becslésekhez jutottunk (28. ábra), míg HPLC technikával a nem enantiomer specifikus stabilitási állandó értéke 25°C-on a (43) egyenlet alapján 59 körüli értéket eredményezett. A 40 és 50°C-ra kapott, hasonló lefutású titrálási görbék 28, illetve 25 körüli átlagos stabilitási állandókat szolgáltatottak. Az állandók nagy bizonytalansága miatt a 25°C-ra számított királis szelektivitás $\alpha_c = 1,08$ csak tájékoztató jellegű.

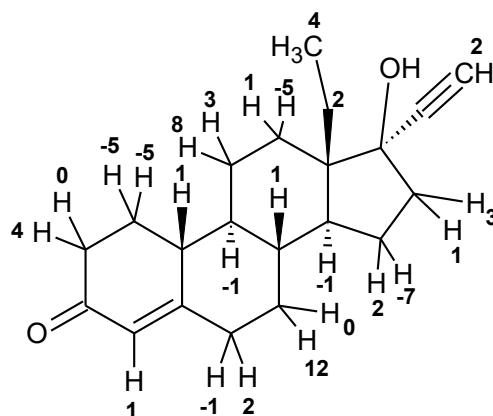
2:1 komplex feltételezésével romlott az OPIUM által illesztett görbék illeszkedése és nem kaptunk kémiaiilag értelmezhető stabilitási állandókat. Ismert, hogy az 1:1 és a 2:1 arányú komplexek stabilitási állandóinak egyidejű számítása matematikai nehézségekbe ütközhet [99], a jelen titrálás ráadásul a *d*- és *l*-enantiomerek kompetíciója mellett zajlott, ami tovább fokozza a kvantitatív kiértékelés nehézségeit.



28. ábra Racém Norgestrel három protonjának 800 MHz-es NMR titrálási pontjai β -CD-vel 25°C-on, illetve az OPIUM programmal, 1:1 komplex feltételezésével illesztett görbék

A CD-komplex(ek) szerkezetét 1 mM *d*-Norgestrel / 3 mM β -CD mintán, 1:1 térfogat-arányú C_2D_5OD - D_2O oldószerkeletben vizsgáltuk 25°C-on. A NOESY és ROESY spektrumok nem szolgáltatottak értékelhető intermolekuláris NOE csúcsokat, ezért a $\Delta\delta^G$ komplexképződési eltolódásokat regisztráltuk az összes szénkötésű protonra (29. ábra). A

legnagyobb számértékű változások a molekula középső részére lokalizálhatók. Figyelembe véve, hogy $\Delta\delta^G$ az irodalomban gyakran használt, de kevésbé biztos forrása a szerkezeti információknak, mint a NOE, nem próbálkoztunk meg a viszonylag kis változásokból szerkezeti következtetéseket levonni.

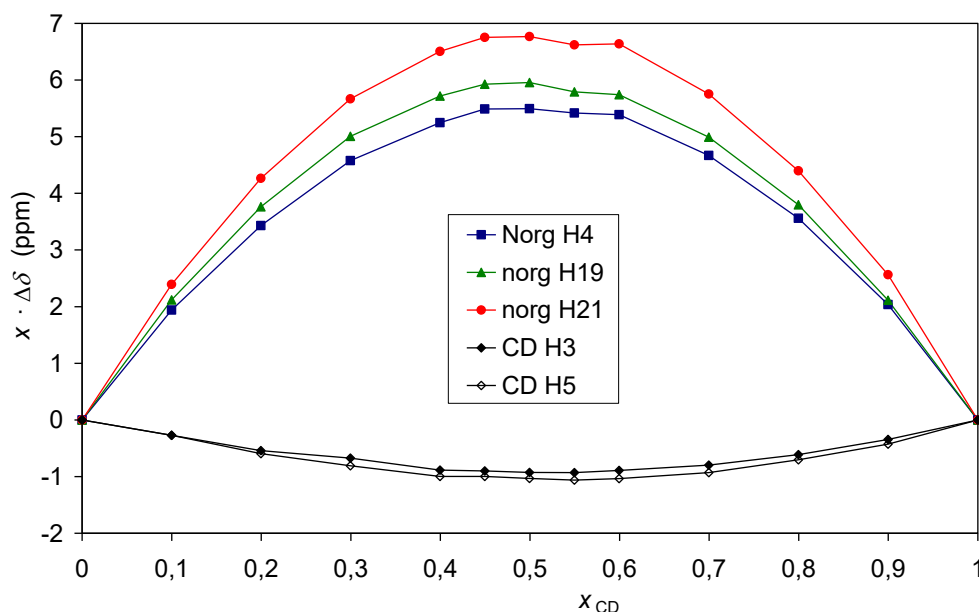


29. ábra A *d*-Norgestrel protonjainak kémiai eltolódás változása (ppb egységben) 3 mM β -CD hatására

6.2.2.3. γ -CD hatása

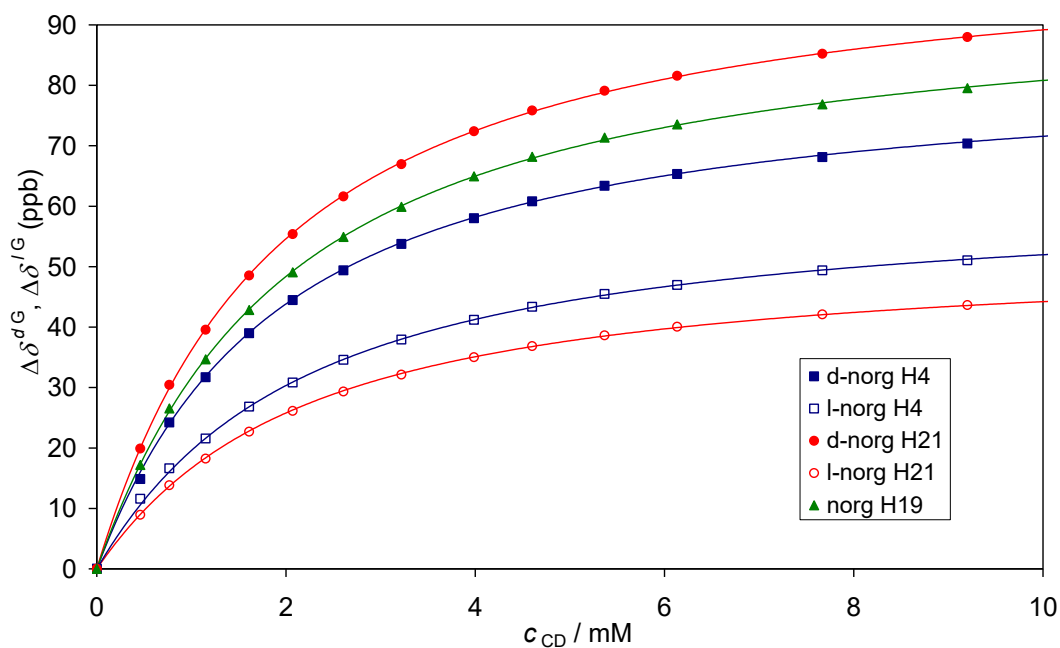
A HPLC-vel tapasztalt hatékony királis elválasztás indokolta, hogy a γ -CD-vel történő komplexképzést NMR módszerekkel is részletesen jellemezzük, különös tekintettel a hőmérséklet hatására.

A sztöchiometriai viszonyok tanulmányozására itt is Job módszerét alkalmaztuk. Mind a Norgestrel három indikátormagjára, mind a CD „belső” H3 és H5 protonjaira kapott görbék 0,5-ös CD móltörténél mutattak szélsőértéket (30. ábra), igazolva az 1:1 komplex szinte kizárólagos képződését. Tárkányi Gábor az általa mért titrálási görbék linearizálása során jutott ugyanerre a következtetésre [84].

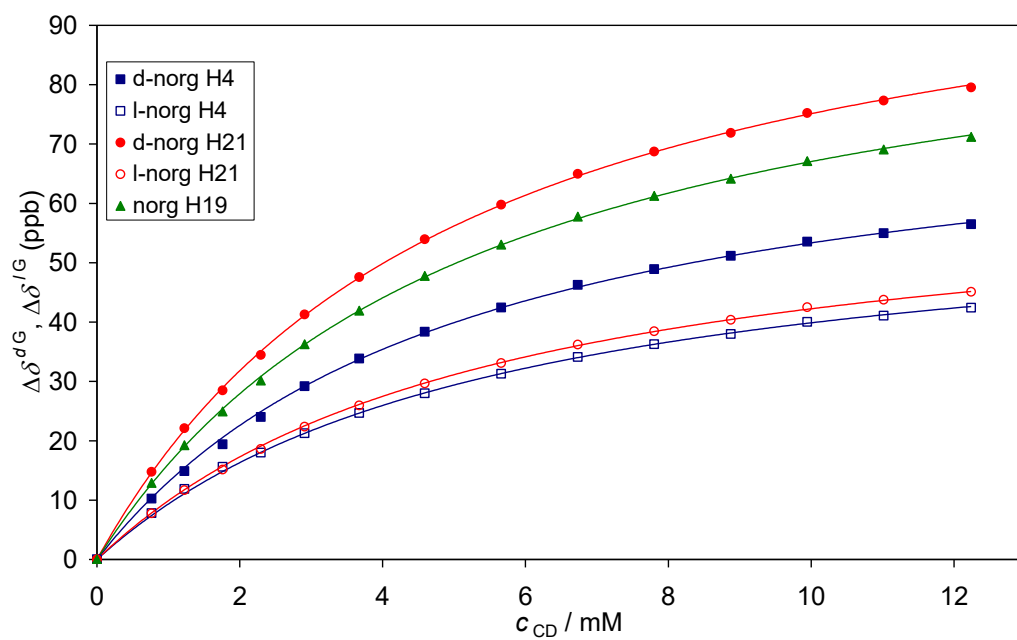


30. ábra A *d*-Norgestrel három és a γ -CD kétfajta protonjának Job görbéi 800 MHz-en és 25°C-on

A racém Norgestrelt 25, 30, 40, 48 és 50°C hőmérsékleteken titráltuk γ -CD-vel, a 31. és 32. ábrán a két szélső hőmérsékleten mért titrálások adatpontjait mutatjuk be, az OPIUM programmal illesztett görbékkel együtt. A H21 acetilénprotonon jelentős, a H4 olefinprotonon kisebb enantiomer felhasadás tapasztalható, míg a H19 metiljel egyik hőmérsékleten sem kettőződött meg. Utóbbi ténytet már Tárkányi Gábor is „anomálisnak” találta a 30°C-on végzett NMR titrálása értékelésekor és szerkezeti okokra próbálta visszavezetni [84]. A különböző hőmérsékletekre kapott $\Delta\delta_{dG}^i$ és $\Delta\delta_{IG}^i$ határeltolódásokat, valamint ezek $\Delta\Delta\delta_{\infty}^{G,i}$ eltéréseit a 13. táblázatban foglaltuk össze. A $\Delta\Delta\delta_{\infty}^{G,i}$ non-ekvivalencia értékek kismértékben csökkennek a hőmérséklet emelkedésével.



31. ábra A racém Norgestrel három protonjának 500 MHz-es NMR titrálási görbái γ -CD-vel 25°C-on



32. ábra A racém Norgestrel három protonjának 500 MHz-es NMR titrálási görbái γ -CD-vel 50°C-on

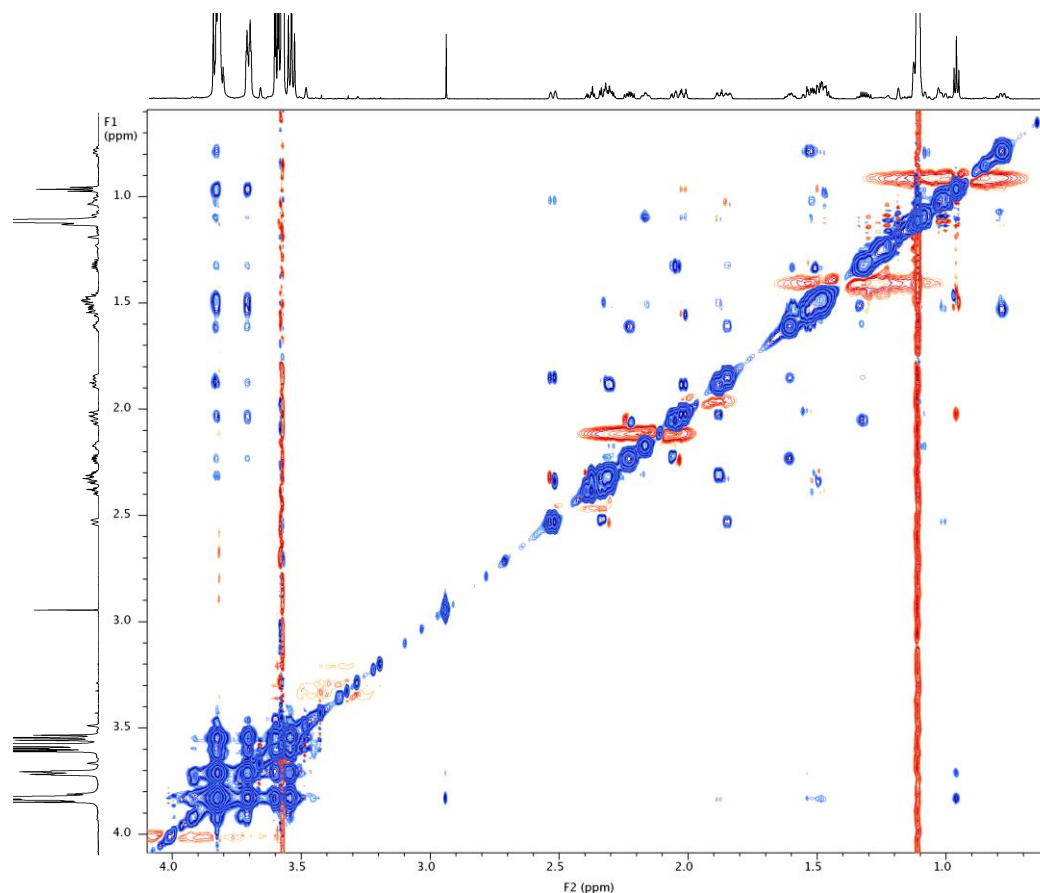
13. táblázat A Norgestrel enantiomerek királis kettőződést mutató jeleinek maximális kémiai eltolódás változásai γ -CD hatására különböző hőmérsékleteken, 500 MHz-en.

t (°C)	$\Delta\delta_{dG}^{H21}$	$\Delta\delta_{IG}^{H21}$	$\Delta\Delta\delta_{\infty}^{G,H21}$	$\Delta\delta_{dG}^{H4}$	$\Delta\delta_{IG}^{H4}$	$\Delta\Delta\delta_{\infty}^{G,H4}$
25	104,2	52,8	51,4	83,7	62,1	21,6
30	104,8	54,3	50,5	82,3	61,4	20,8
40	107,6	58,7	48,9	80,7	61,0	19,7
48	113,5*	66,6*	46,9*	81,5*	62,7*	18,8*
50	111,7	64,7	47,0	79,4	61,1	18,3

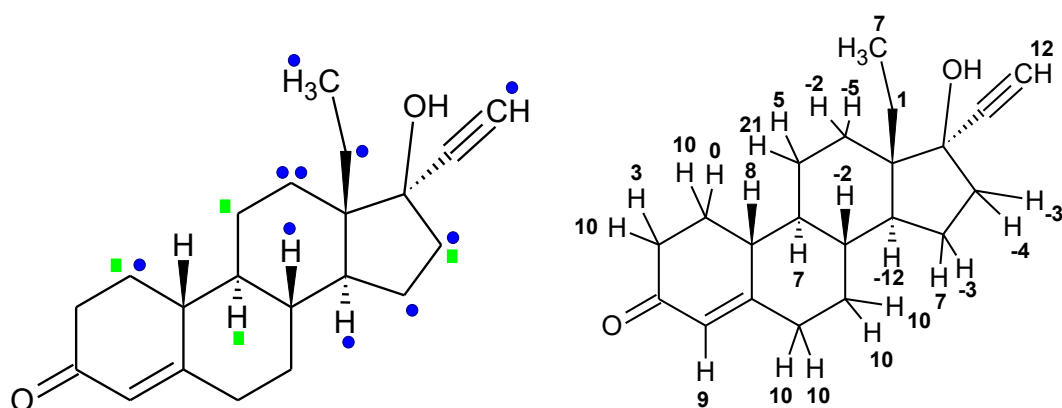
*800 MHz-es titrálás eredményei

6.2.3. A kialakult zárványkomplex szerkezete

A *d*-Norgestrel/ γ -CD komplex szerkezetéről próbáltunk információt nyerni 2D NOESY és ROESY spektrumok segítségével (l. 33. ábra). A CD belső üregbeli H3 és H5 protonjaival kapott NOE-k a szteroid C és D gyűrűjére koncentrálnak (34. ábra). Ezt alátámasztja a 13. táblázatban közölt jelentős $\Delta\delta_{dG}^i$ komplexképződési határeltolódás a H21 acetilén protonra, viszont a 33. ábrán az A és B gyűrűre is kaptunk 10 ppb körüli $\Delta\delta_{G,i}^{G,i}$ értékeket. Utóbbiak magyarázata óvatosságot igényel, de valószínű, hogy a γ -CD nemcsak az acetilénproton oldaláról tudja magába foglalni a szteroid vázat, ez csupán az egyik domináns kötőmód, de további, az A és B gyűrűket érintő alternatív kötődési geometriák is megvalósulhatnak az 1:1 komplex képződése során.



33. ábra 1 mM *d*-Norgestrelt és 1 mM γ -CD-t tartalmazó oldatról $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}-\text{D}_2\text{O}$ 1:1 v/v oldószerkelegben 25°C-on 800 MHz-en 0,5 s keverési idővel készített NOESY spektrum



34. ábra Balra: A 33. ábrán szereplő NOESY spektrumban észlelt erős/közepes NOE-k eloszlása a *d*-Norgestrel szteroid protonjain a γ -CD H3 (■), illetve H3 és H5 protonjaival (●) szemben. Jobbra: az 1 mM γ -CD hatására a szteroid protonok $\Delta\delta^{\text{G},i}$ kémiai eltolódás változásai, ppb egységben (vö. a számértékek nagyságát a β -CD-re kapott értékekkel a 29. ábrán!)

6.2.4. A γ -ciklodextrinnel kapott HPLC és NMR eredmények összehasonlítása

A HPLC és NMR technikákkal kapott adatok alapján enantiomer specifikus stabilitási állandókat, majd belőlük királis szelektivitás értékeket számítottunk különböző hőmérsékleteken (14. táblázat).

14. táblázat Királis szelektivitás α_c , enantiomer specifikus kötődési állandó K_d , K_l értékek

t (°C)	α_c HPLC	α_c NMR	K_d (M ⁻¹) K_l (M ⁻¹) HPLC	K_d (M ⁻¹) K_l (M ⁻¹) NMR
10	1,20 ± 0,04*	–	750 ± 2 624 ± 2	–
20	1,19 ± 0,04	–	500 ± 3 419 ± 4	–
25	1,19 ± 0,04	1,15 ± 0,01	412 ± 4 346 ± 5	614 ± 3 532 ± 5
30	1,19 ± 0,05	1,12 ± 0,02	337 ± 5 283 ± 6	501 ± 4 446 ± 6
30*	–	1,14 ± 0,02*	–	469 ± 8* 410 ± 9*
40	1,20 ± 0,06	1,09 ± 0,01	232 ± 9 194 ± 10	325 ± 3 298 ± 4
48	–	1,12 ± 0,02	–	232 ± 6 208 ± 6
50	1,21 ± 0,08	1,09 ± 0,02	156 ± 16 130 ± 20	211 ± 2 193 ± 3

* A [84] publikációból vett értékek

Minden esetben a *d*-Norgestrellel történő komplexképzés a preferált. 30°C-on lehetséges az összehasonlítás Tárkányi Gábor eredményével [84]: az α_c érték jó egyezést mutat, míg a korábban publikált K_d és K_l egyensúlyi állandók szisztematikusan kisebbek kb. 7%-kal a jelen doktori munkában kapott értékeknél. Utóbbi eltérésnek egy feltételezett oka lehet, hogy a korábban felhasznált γ -CD víztartalma eltért az általunk alkalmazottól – ill. nem ismerjük a CD tényleges víztartalommal történő korrekcióját a pontos CD koncentráció

megadásához – a valóságosnál nagyobb c_{CD} értékekkel történő kiértékelés kisebb kötődési állandóhoz vezet.

Az általam HPLC-vel mért kötődési állandók $\sim 20\text{-}30\%$ -kal alacsonyabbak az NMR mérések során kapott értékeknél, ilyen eltérésre az irodalomban is találunk példát (7. táblázat a [84] cikkben). Ennek egyik oka lehet a deuterált oldószerkomponensek használata az NMR vizsgálatoknál. A másik ok: NMR-rel a szteroid-CD kölcsönhatást egy biner gazdavendégmolekula rendszerben vizsgáljuk, nincs jelen szilárd fázis, míg a HPLC elválasztásoknál számolnunk kell az állófázis eredményezte további kölcsönhatásokkal is (l. a 3.2.3.3. irodalmi fejezetben leírtakat). A két független technikával mért α_c királis szelektivitások sokkal jobb, 0,1 egységen belüli egyezést mutatnak és alig változnak a hőmérséklettel. Mivel β -CD-vel (és később egyes permetilezett-CD-kkel) is mértünk 1,08 vagy nagyobb királis szelektivitásokat, ezért önmagában α_c nem elegendő a kromatográfiás enantiomer elválasztás előrejelzéséhez. Ehelyett Tárkányi Gábor konklúzióját sikerült megerősíteni széles hőmérséklet-tartományban is: egy határérték felett kell lennie mind a K_d , K_l stabilitási állandóknak (> 200), mind pedig α_c hányadosuknak ($> 1,1$) a sikeres HPLC elválasztáshoz. Ez alátámasztja azt az általános és intuitív megállapítást, hogy a CD tartalmú HPLC elválasztásokban gyakran a termodinamikai szelektivitás, tehát a diasztereomer komplexek eltérő stabilitása a mozgó fázisban játssza a kulcsszerepet és ez NMR titrálással előre jelezhető.

Az NMR-rel kapott kötődési állandókból is meghatároztuk a komplexképzés termodinamikai paramétereit. A 15. táblázat oszlopait összevetve kb. 3 kJ mol^{-1} szisztematikus eltérés mutatkozik a kapott ΔH értékek között, amit szintén okozhat a HPLC-ben az állófázissal való kölcsönhatás.

15. táblázat Norgestrel enantiomerek γ -CD komplexeinek a $-RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ lineáris regressziója alapján számított termodinamikai jellemzői mindkét alkalmazott technika esetén

	$\Delta H^\circ (\text{kJ mol}^{-1})$		$\Delta S^\circ (\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1})$		$r^2 (n)$	
	HPLC	NMR	HPLC	NMR	HPLC	NMR
<i>d</i> -Norgestrel	$-29,9 \pm 0,5$	$-34,3 \pm 0,5$	$-50,2 \pm 1,7$	-62 ± 2	0,998 (6)	0,998 (5)
<i>l</i> -Norgestrel	$-29,9 \pm 0,6$	$-33,0 \pm 1$	$-51,7 \pm 2,0$	-58 ± 3	0,997 (6)	0,991 (5)
$\Delta (d-l)$	$0,0 \pm 0,6$	$-1,3 \pm 1$	$1,5 \pm 2$	-4 ± 4	-	-

r^2 , korrelációs koefficiens négyzet, n , a pontok száma;
 \pm jel után a legkisebb négyzetek módszerével számított hiba

6.2.5. Eredmények, következtetések

A Norgestrel enantiomerek folyadékkromatográfiás elválasztásakor az α -CD natív ciklodextrin királis szelektor hozzáadásával nem tapasztaltam változást a CD nélküli analízishez képest. Az ^1H NMR titrálások sem mutattak egyik jelen sem királis kettőződést, valamint az egyensúlyi állandó értéke is csak becsülhető ($K < 5$) 1:1 komplexet feltételezve. A kis állandó igen kis stabilitású komplex képződésére utal, ami összhangban van a folyadékkromatográfiában tapasztaltakkal.

A β -CD királis szelektor alkalmazása a HPLC elválasztásban jelentősebb retenció idő csökkenést eredményezett királis felismerés nélkül, mely gyenge zárványkomplex kialakulására utal. Az ^1H NMR titrálások során jel kettőződést tapasztaltunk mindhárom vizsgált jelen és becsült stabilitási állandó értékeket adtunk meg 25, 40 és 50°C hőmérsékleten 1:1 arányú komplexet feltételezve. A kapott eredmények igazolják, hogy kialakul a zárványkomplex, mely alátámasztja a HPLC tapasztalataimat. Job módszerét alkalmazva vizsgáltam a képződő komplex sztöchiometriáját és elsőként sikerült valószínűsíteni a 2:1 arányú komplex képződését β -CD-vel az 1:1 arányú komplex mellett.

A Norgestrel enantiomerek elválasztását a natív ciklodextrinek közül a nagyobb üregméretű γ -CD-vel sikerült megvalósítani. A folyadékkromatográfiás kísérleteim eredményeit összegezve megállapítható, hogy a mozgófázis szerves tartalmának csökkentése, a nagyobb γ -ciklodextrin koncentráció és az alacsonyabb hőmérséklet kedvez az enantiomerek alapvonalon történő elválasztásának. A HPLC elválasztások és az ^1H NMR titrálások különböző hőmérsékleten kapott eredményeiből enantiomer specifikus kötődési állandót (K_d , K_l) és királis szelektivitás (α_c) értékeket adtunk meg. Megállapítottuk, hogy α_c önmagában nem elegendő a kromatográfiás elválasztás előrejelzéséhez: egy határérték felett kell lennie mind a K stabilitási állandóknak, mind pedig α_c hányadosuknak ($K > 200$, $\alpha_c > 1,1$). A képződő komplex sztöchiometriájának tanulmányozására Job módszerét alkalmaztuk, melyből az 1:1 arányú komplex képződését állapítottuk meg. A HPLC adatokból is az 1:1 arányú komplex létrejöttét feltételezhetjük. Végül a *d*-Norgestrel/ γ -CD komplex szerkezetéről 2D NOESY és ROESY spektrumok segítségével kaptunk információt.

6.3. Előkísérletek permetilezett ciklodextrinekkel

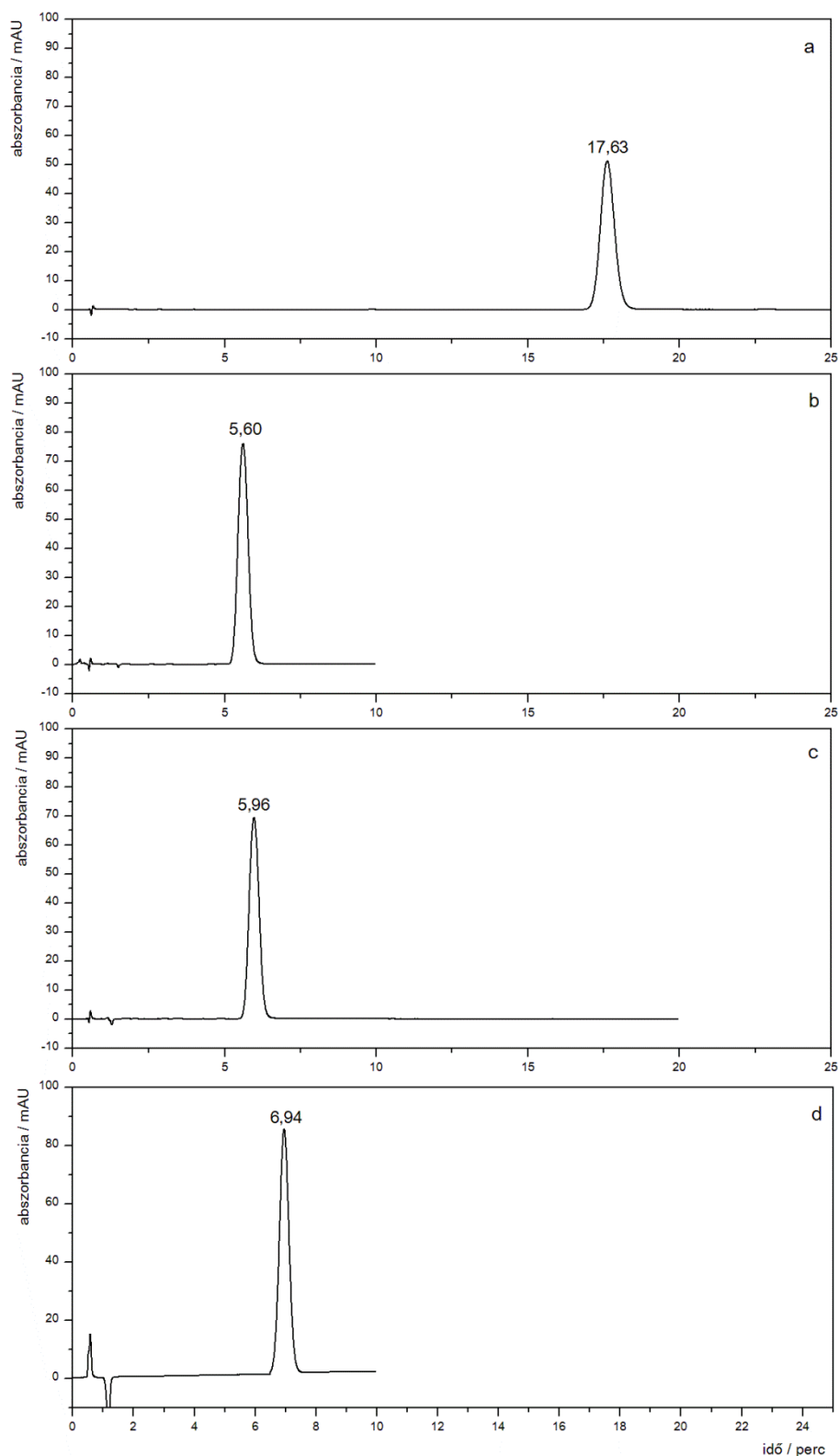
A Norgestrel enantiomerek további HPLC elválasztására kitekintésképpen olyan királis szelektort kerestem, amely a natív ciklodextrinek származéka, mindhárom üregméretben (α -, β -, γ -) elérhető, valamint az adott származék állófázishoz kötött formában is megvásárolható. Ezen szempontok figyelembevételével választottam a permetilezett ciklodextrineket. A származékképzés miatt a vendégmolekulával való H-kötés kialakulásának a lehetősége csökken a PM-CD-kkel, mivel a „szabad” OH-csoportokat metil-csoportokkal helyettesítik. Megnö vizsont a makromolekula hidrofóbicitása és ezzel az oldhatósága számos szerves oldószerben. A külső peremen található metoxicsoportok kb. 3 Ångströmmel „hosszabbítják meg” a kónuszt, megnő a belső üregméret is és érdekes módon ez a natívnál kevésbé lesz hidrofób, megváltoztatva a zárványkomplekképzés és a királis felismerés feltételeit [158].

A permetilezett ciklodextrinekkel is végeztünk NMR titrálásokat különböző hőmérsékleteken, elsősorban a stabilitási állandók meghatározására (csak 1:1 arányú komplexek képződését feltételezve) és a királis felismerés szerkezeti aspektusainak tanulmányozására.

6.3.1. A mozgófázisban alkalmazott permetilezett ciklodextrinek

A Norgestrel enantiomerek permetilezett ciklodextrinekkel történő elválasztását az összehasonlíthatóság miatt a natív CD-k használata során alkalmazott kiindulási körülményeken kezdtem. A PM-CD nélküli és a 3 különböző PM-CD szelektor alkalmazásával kapott kromatogramokat a 35. ábrákon mutatom be.

6.3.1. A mozgófázisban alkalmazott permetilezett ciklodextrinek



35. ábra A racém Norgestrel elválasztása (a) királis szelektor nélkül, (b) 4,8 mM PM- α -CD, (c) 4,8 mM PM- β -CD, (d) 4,8 mM PM- γ -CD tartalmú mozgófázisban

Körülmények: oszlop: Luna C₁₈ (2) (50 x 3 mm, 3 μ m); eluens: 50% (v/v) MeOH vízben; hőmérséklet: 25°C; áramlási sebesség: 0,5 ml/perc; injektált térfogat: 3 μ l a 0,1 mg/ml koncentrációjú racém Norgestrel oldatból; detektálás: 244 nm hullámhosszon

A folyadékkromatográfiás elválasztásoknál a mozgófázisban alkalmazott 5 mM bemérési koncentrációjú (víztartalommal és a metanol-víz oldószer elegy térfogati kontrakcióval korrigált, 4,8 mM koncentrációjú) permetilezett- α -, - β - és - γ -ciklodextrinek egyikével sem értünk el enantiomer elválasztást (35. ábra). A retenciós idő jelentősen lecsökkent, mindhárom esetben gyakorlatilag hasonló értéket kaptam a királis szelektor nélküli rendszerben mérthez képest, ami a királis szelektor és a vizsgált komponens közötti kölcsönhatást igazolja, azonban a két enantiomer kötődése számottevő különbséget nem mutatott, így nem történt meg a királis felismerés.

Az irodalomból ismert és saját tapasztalataim is azt mutatják, hogy a permetilezett ciklodextrinek erősen kötődnek az állófázishoz, így egy „kvázi” királis állófázist eredményeznek [159]. Kísérleteimben ezért minden PM-CD tartalmú mozgófázis használata után metanol-víz 8:2 (v/v)[&] arányú elegyével lemostam az oszlopot, majd a Norgestrel retenciós idejének ellenőrzését követően, annak megfelelősége esetén folytattam az analízist.

Nem enantiomer specifikus egyensúlyi állandót számítottam a natív ciklodextrineknél alkalmazott (43) egyenlet alapján (16. táblázat) figyelembe véve a PM-CD-k víztartalmát és a metanol-víz 1:1 (v/v) oldószer elegy térfogati kontrakcióját 25°C-on (0,9644) [156].

16. táblázat A racém Norgestrel nem enantiomer specifikus egyensúlyi állandó értékei (K) Kromatográfiás körülmények a 35. ábrán

$t / ^\circ\text{C}$	$K (\text{M}^{-1})$		
	PM- α -CD	PM- β -CD	PM- γ -CD
25	490 ± 3	447 ± 4	347 ± 4
40	458 ± 5	437 ± 5	319 ± 6
50	402 ± 7	396 ± 7	304 ± 8

A táblázat adataiból megállapítható, hogy a komplex stabilitása a hőmérséklet emelésével és a királis szelektor ürgeméretének növelésével csökken. A permetilezett- α - és a permetilezett- β -származékokkal történő elválasztások lényeges eltérést mutatnak a megfelelő natív CD-k alkalmazásához képest, erősebb kötődés figyelhető meg a megfelelő natív szelektorok adataihoz képest – kifejezettebb retenciós idő csökkenést tapasztaltam, melyet az irodalmak is alátámasztanak [161].

[&] A PM-CD-k C_{18} állófázisról történő eltávolításához magasabb szerves koncentrációjú eluens összetétel szükséges [160].

17. táblázat A racém Norgestrel egyensúlyi állandó értékei PM- γ -CD ill. γ -CD szelektorok alkalmazásakor Kromatográfiás körülmények a 35. ill. 18. ábrán

$t / ^\circ\text{C}$	K^* (M^{-1})	K_d^{**} (M^{-1})	K_l^{**} (M^{-1})
	PM- γ -CD	γ -CD	γ -CD
25	347 ± 4	412 ± 4	346 ± 5

*Nem enantiomer specifikus egyensúlyi állandó

** Enantiomer specifikus egyensúlyi állandó

A γ -CD és a PM- γ -CD királis szelektorral kapott stabilitási állandó értékek (17. táblázat) 25°C-on kevésbé térnek el – a retenciós idő csökkenésben nincs nagymértékű különbség, azonban az enantiomerek egymás mellett a PM- γ -CD-vel nem különböztethetők meg.

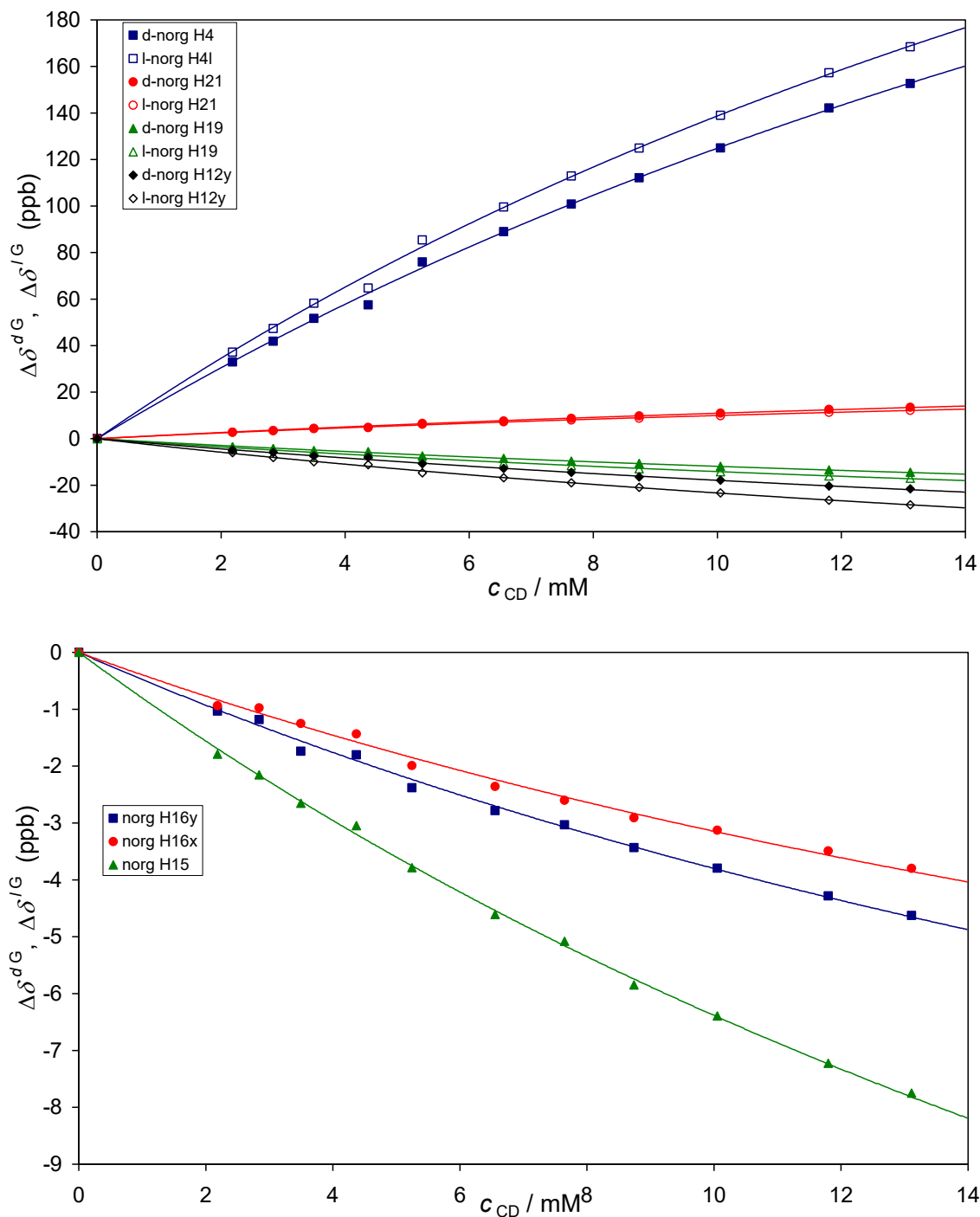
6.3.2. PM-CD és a Norgestrel enantiomerek kötődésvizsgálata NMR titrálásokkal

Ismeretes [94], hogy az NMR-ben spektrumvonalak királis megkettőződése nemcsak a kölcsönhatás erősségétől, hanem az egyes szteroid-protonok CD-indukálta non-ekvivalenciájától ($\Delta\Delta\delta_\infty^{G,i}$) is függ és az utóbbi hatást nehéz előre megbecsülni, még az enantiomerekkel képzett komplexek szerkezetének *a priori* ismeretében is.

6.3.2.1. A PM- α -CD-vel kialakult komplexek vizsgálata

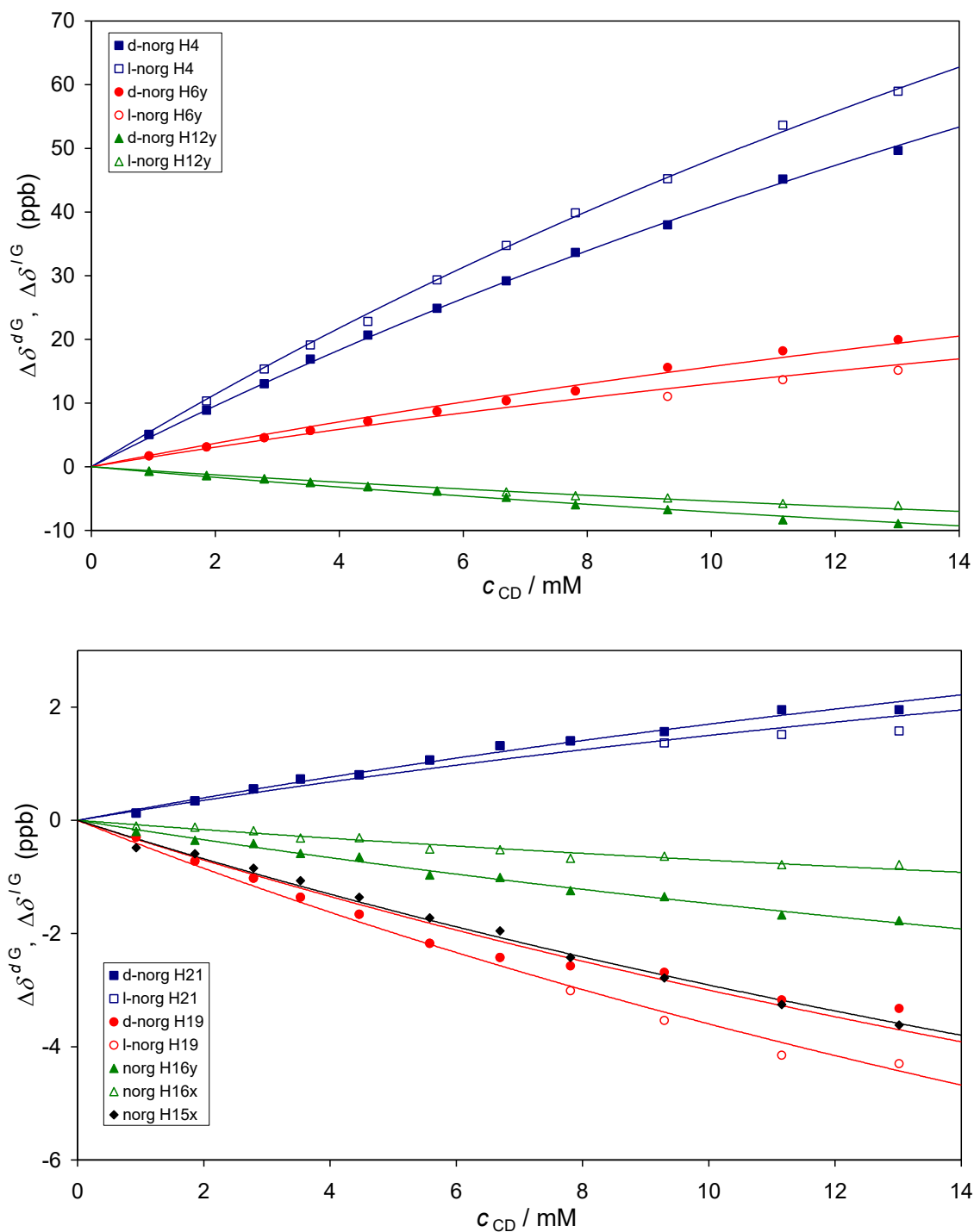
A PM- α -CD-vel 25°C-on végzett titrálás során a kémiai eltolódás változása és a non-ekvivalencia egyaránt a H4 olefinjelen volt a legnagyobb (36. ábra), ráadásul az enantiomerek jelsorrendje is megfordult, $\delta^{I/G,H4} > \delta^{d/G,H4}$. Feltételezhető, hogy az A gyűrű a többinél jelentősebb szerepet játszik ezen zárványkomplex képződésében. Az acetilén- és olefinprotonon kívül igyekeztük a Norgestrel lehető legtöbb (nem átfedő, illetve egyszerű multiplettet adó) protonjának kémiai eltolódását leolvasni a minél pontosabb állandók számításához. Így kismértékű királis felbontást észleltünk a H19 metiljelen, az egyik H12 protonon (H12y), valamint a H21 acetilénprotonon. A D gyűrű H16 és H15 protonjain viszont nem detektáltuk a multiplettek királis megkettőződését. Egyes jelek kémiai eltolódása

csökkent a ciklodextrin hozzáadására (*upfield complexation shift*), illetve a natív CD-k esetén nem tapasztaltunk, de mivel monoton lefutású titrálási görbéket adtak, így bevontuk azokat a szimultán regresszióba (36. ábra).



36. ábra A racém Norgestrel egyes protonjainak 800 MHz-es NMR titrálási görbéi PM- α -CD-vel 25°C-on

NMR-titrálással 50°C-on is vizsgáltuk a komplexképződést a racém Norgestrel és a PM- α -CD között (37. ábra).



37. ábra A racém Norgestrel egyes protonjainak 800 MHz-es NMR titrálási görbéi PM- α -CD-vel 50°C-on

Az 50°C-on kapott NMR titrálási görbék hasonló lefutásúak, mint a 25°C-on kapottak, de (ppb-ben) kisebb változást mutatnak (37. ábra). 50°C-on is a H4 olefinproton volt legérzékenyebb „indikátora” a komplexképzésnek (37. ábra), a többi magra jóval kisebb $\Delta\delta$

értékeket regisztráltunk. A királis jelkettőződés csak 8 mM-nál nagyobb CD-koncentrációknál volt megfigyelhető a H6y és H19 spinek esetén.

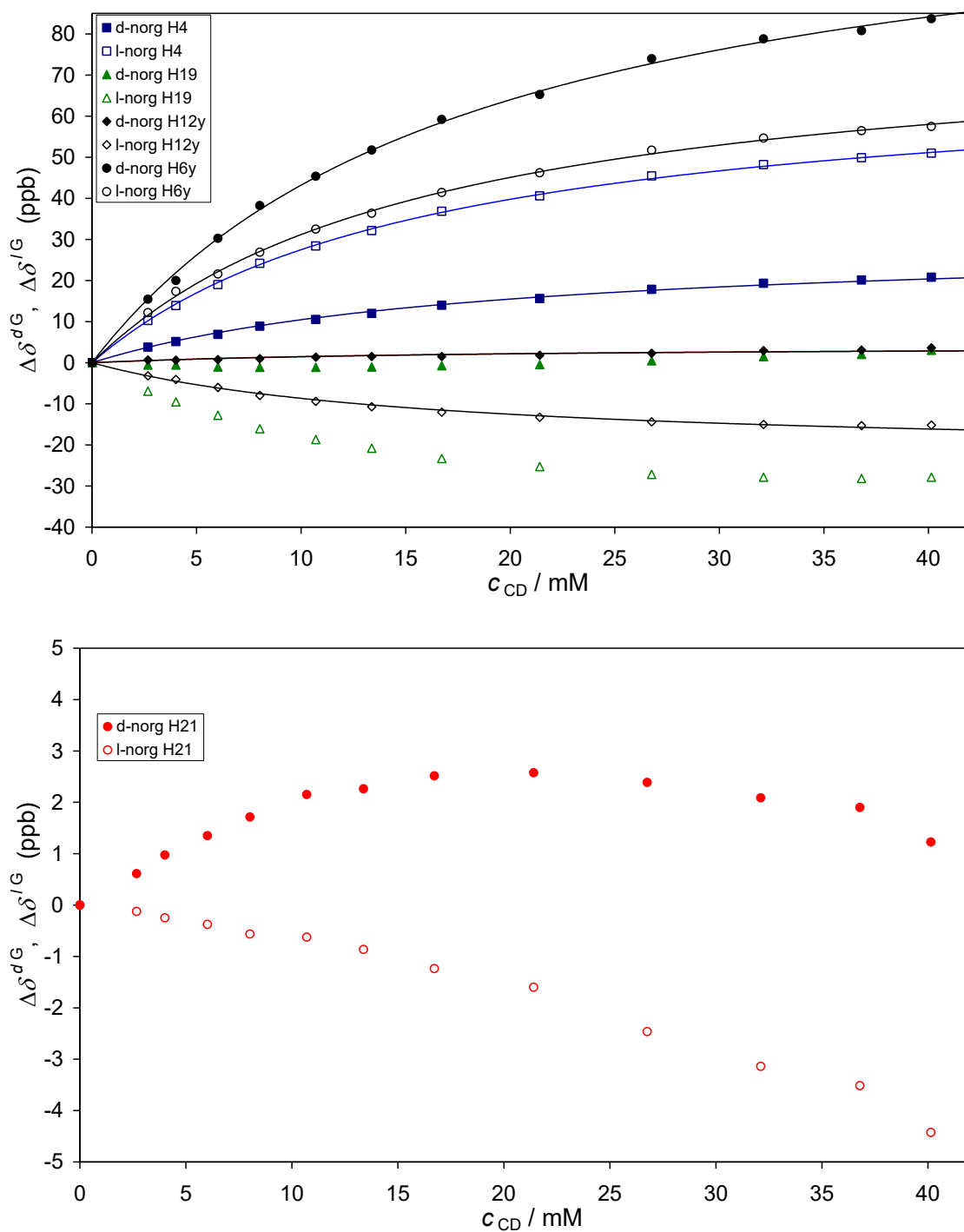
18. táblázat A PM- α -CD-vel képzett 1:1 komplexek NMR titrálásból számított stabilitási állandói (K_d , K_l)

$t / ^\circ\text{C}$	K_d	K_l	α_c
25	$30,0 \pm 0,3$	$33,6 \pm 0,3$	$1,13 \pm 0,02$
50	23 ± 2	24 ± 2	-

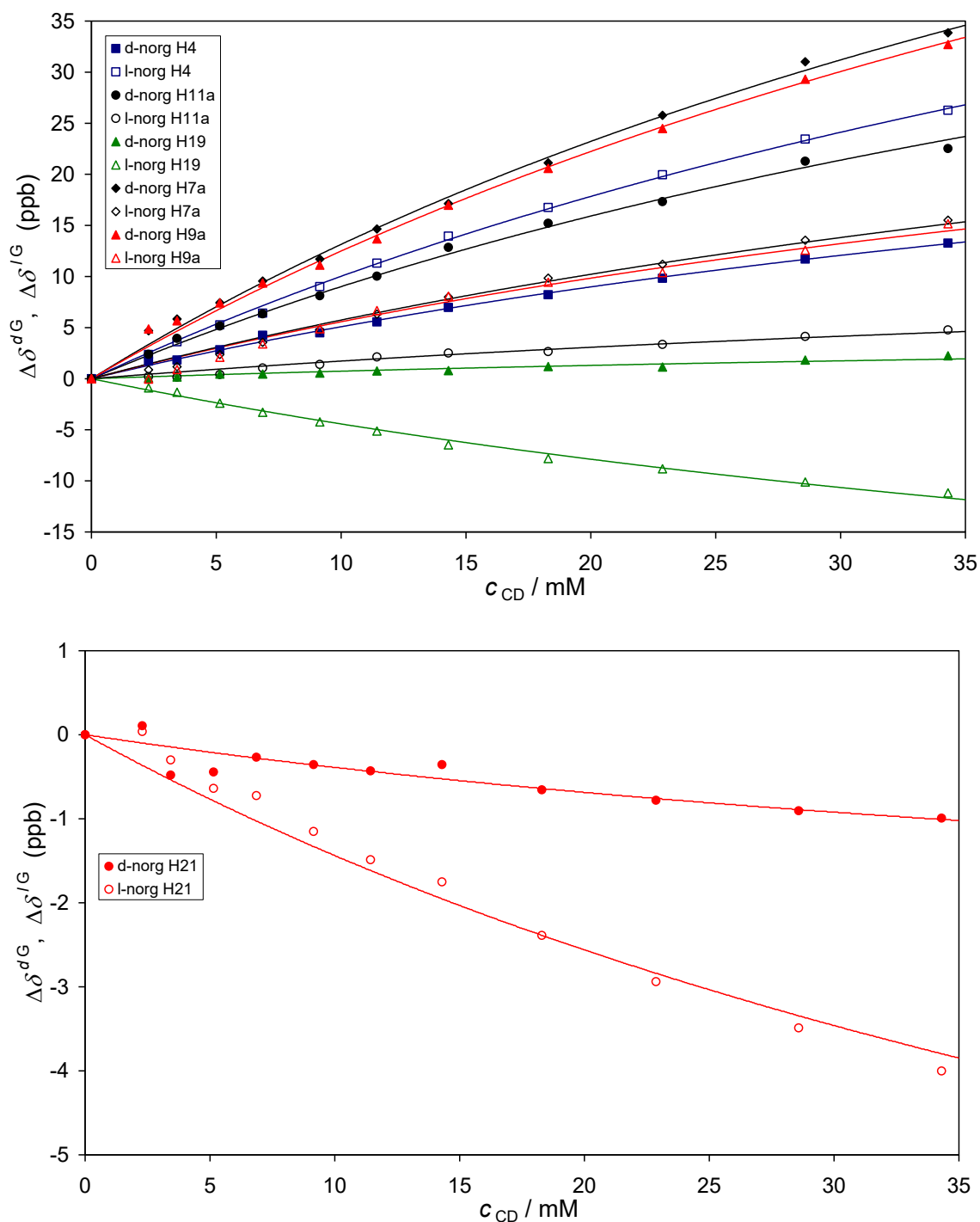
Az OPIUM programmal kapott stabilitási állandók (18. táblázat) nagyságrendileg hasonlítanak a natív β -CD-vel 40°C-on mért értékekhez, ám azoknál sokkal megbízhatóbbak, kisebb szórásúak, ami a 7-7 titrálási görbe szimultán kiértékelésének, a nemlineáris regresszió szabadsági foka jelentős növekedésének köszönhető. Az α_c érték ugyan szignifikánsan nagyobb 1-nél, viszont a komplexek kis stabilitása miatt ez nem elegendő a sikeres HPLC elválasztáshoz. Az 50°C-on regisztrált kis $\Delta\delta$ értékek még a 25°C-osnál is gyengébb komplexképződésre utalnak. A mérési adatpontok nagyobb szórásából is adódóan nagyobb szórással sikerült a komplexstabilitási állandókat kiszámítani, így az adatokat kisebb pontossággal adtuk meg (18. táblázat). Az *l*-Norgestrel kissé nagyobb stabilitása így nem szignifikáns különbség, mert az állandók konfidencia intervalluma átfed, ezért α_c értéket nem volt értelme számítani.

6.3.2.2. A PM- β -CD-vel kialakult komplexek vizsgálata

A permetilezett- β -ciklodextrinnel 25°C-on végzett titrálás során a H4 (A gyűrű) és H6y (B gyűrű) NMR jele egyaránt enantiomer kettőződést mutatott (38. ábra). A C gyűrű H12y metilénprotonjának kémiai eltolódása a *d*-Norgestrelben alig változott, az enantiomerjében viszont csökkent CD hozzáadására. Hasonló jelenséget mutatott a H19 metiljel is, valamint a H21 acetilénproton jele, ezért ezeket a magpárokat kihagytuk a szimultán görbeillesztésből. (Érdekes módon mindkét esetben a *d*-Norgestrel esetén volt szélsőértéke a pontsorozatnak.)



38. ábra A racém Norgestrel egyes protonjainak 800 MHz-es NMR titrálási görbéi PM- β -CD-vel 25°C-on



39. ábra A racém Norgestrel egyes protonjainak 800 MHz-es NMR titrálási görbéi PM- β -CD-vel 50°C-on

Az 50°C-on végzett titrálás során (számítva a gyenge komplexképzésre) még több szénkötésű proton kémiai eltolódását regisztráltuk (39. ábra). A mért $\Delta\delta$ változások kisebbek voltak és a nem monoton titrálási görbék (H19, H21) is nagyobb szórásúvá „alakultak”.

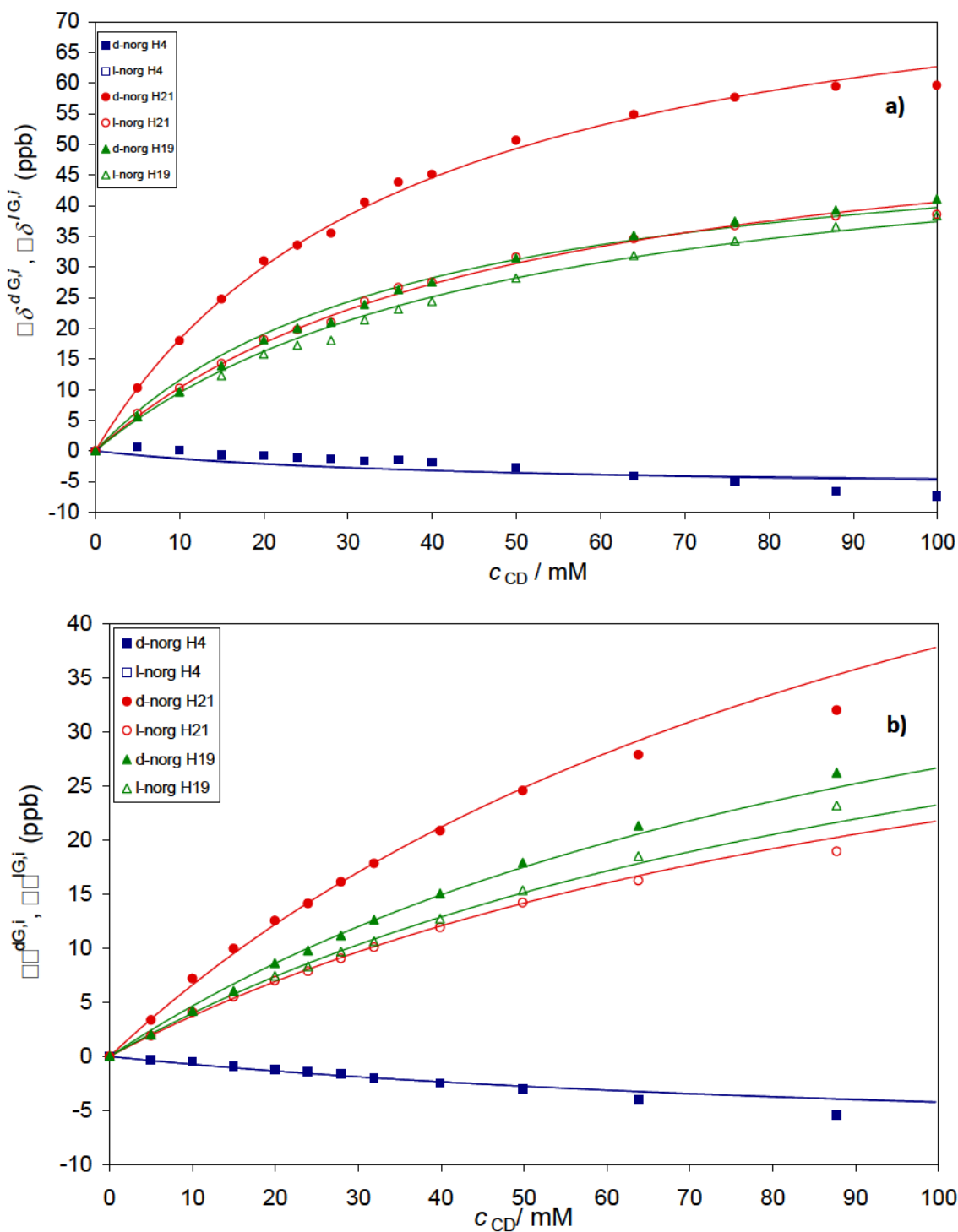
19. táblázat A PM- β -CD-vel képzett 1:1 komplexek NMR titrálásból számított stabilitási állandói

$t / ^\circ\text{C}$	K_d	K_l	α_c
25	55 ± 1	64 ± 1	$1,15 \pm 0,03$
50	15 ± 1	14 ± 1	$1,1 \pm 0,1$

Az összes mért pontsorozat szimultán görbeillesztései a 19. táblázatban megadott K_d és K_l stabilitási állandókhoz vezettek. Az OPIUM programmal végzett kiértékelés az enantiomer-preferencia megfordulását mutatta: az *l*-Norgestrel képez szignifikánsan stabilabb komplexet a PM- β -CD-vel. Az 50°C-on kapott adatok igazolták a gyengébb komplex kialakulását, melyek eltérése nem volt szignifikáns.

6.3.2.3. A PM- γ -CD-vel kialakult komplexek vizsgálata

A PM- γ -CD-vel végzett NMR titrálások során a H21 acetylén- és a H19 metiljel kémiai eltolódása változott jelentősen (és az előbbi enantiomer megkettőződése volt kiemelkedő), míg az olefin H4 csak kis mértékben tolódott el negatív irányba (40. ábra). Ez ellentétben áll a másik két permetilezett ciklodextrinre tapasztaltakkal, ami a kisebb üregméretű PM-CD-kkel képzett zárványkomplexek eltérő szerkezetére utal, valószínűsítve – a natív γ -CD-hez hasonlóan – a D gyűrű és az acetylénsoport domináns szerepét a PM- γ -CD-vel történő komplexképződésben.

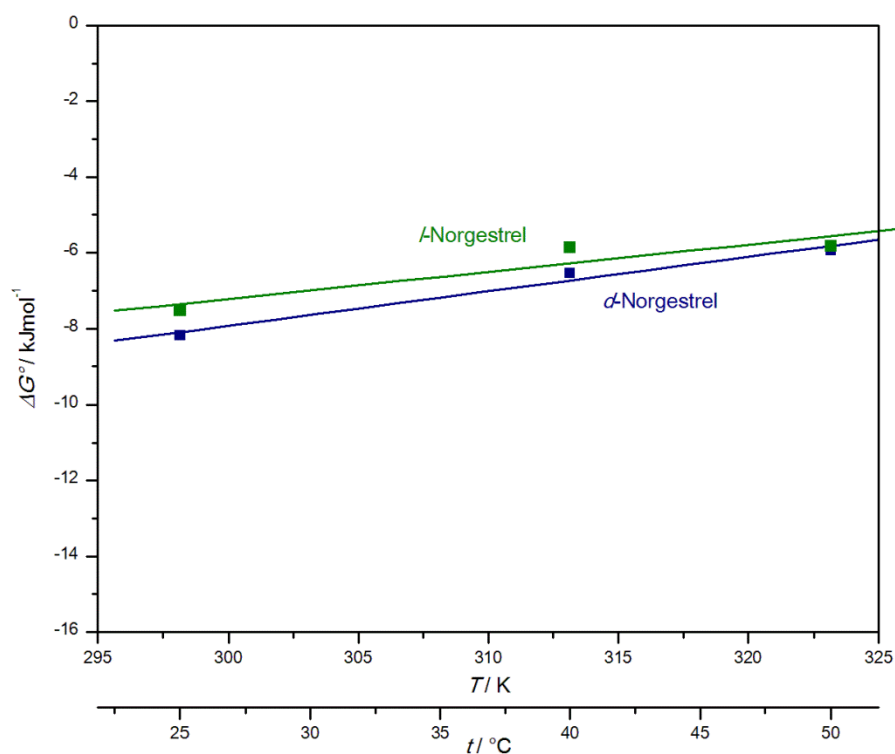


40. ábra A racém Norgestrel egyes protonjainak 500 MHz-es NMR titrálási görbéi PM- γ -CD-vel a. 25°C-on, b. 50°C-on

A titrálási görbéket 25, 40 és 50°C hőmérsékleten kiértékelve a 20. táblázatban szereplő stabilitási állandókat kaptuk, ezek mindegyik esetben a *d*-enantiomer preferenciáját számszerűsítik.

20. táblázat A becsült stabilitási állandó értékek különböző hőmérsékleten PM- γ -CD-vel

$t / ^\circ\text{C}$	K_d	K_l
25	27,1	20,8
40	12,3	9,5
50	9,1	8,7

**41. ábra** Az NMR mérések stabilitási állandóiból számított termodinamikai paraméterek PM- γ -CD esetén

A szabadenergia értéket – $\Delta G^\circ = -RT \ln K = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$ – a hőmérséklet függvényében ábrázolva egyenest kapunk (41. ábra), meredekségéből és a tengelymetszetből termodinamikai adatok számíthatók (21. táblázat).

21. táblázat Norgestrel enantiomerek PM- γ -CD komplexeinek termodinamikai jellemzői

	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	r^2
<i>d</i> -Norgestrel	-35 ± 4	-91 ± 14	0,989
<i>l</i> -Norgestrel	-28 ± 9	-71 ± 29	0,926
$\Delta (d - l)$	-7 ± 9	-20 ± 2	-

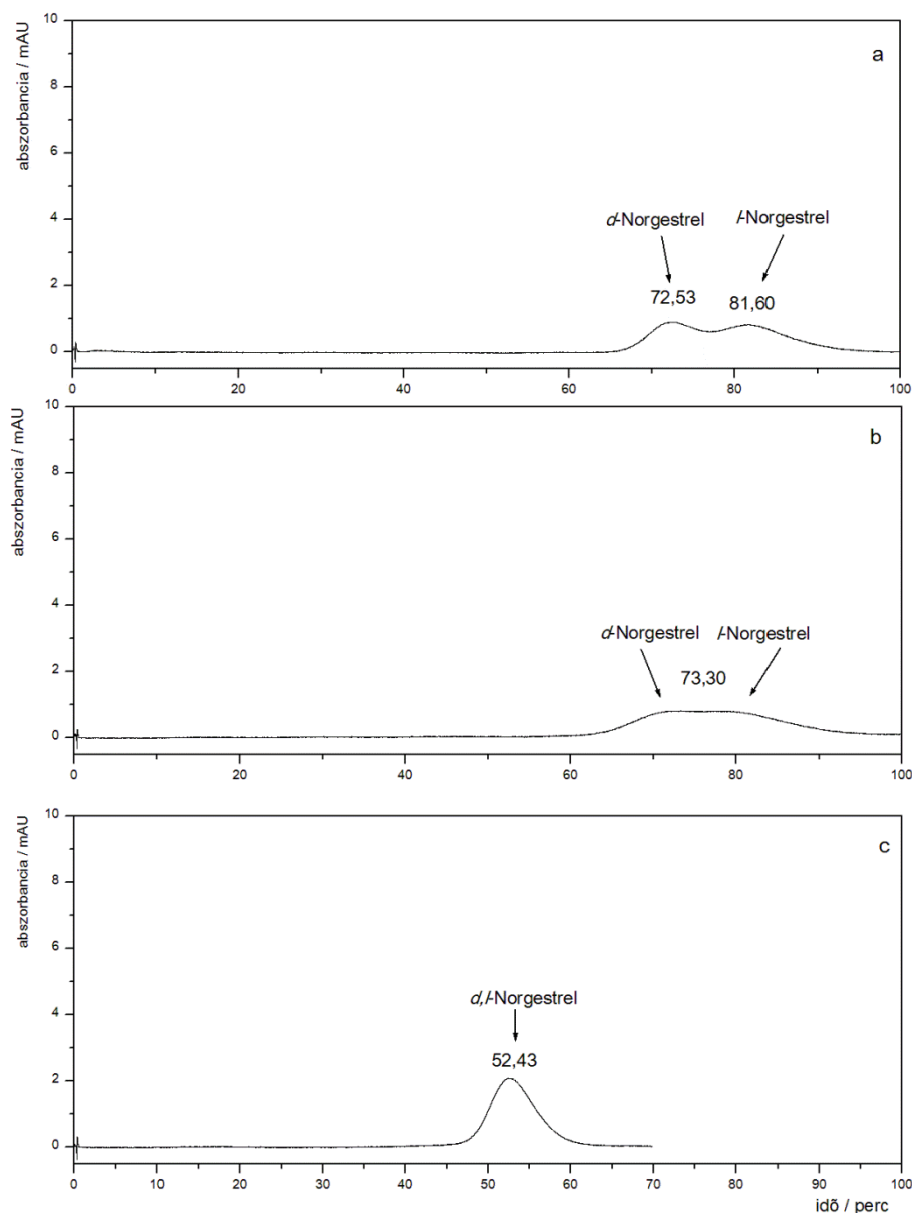
r^2 , korrelációs együttható négyzet;

\pm jel után a legkisebb négyzetek módszerével számított hiba

6.3.3. Állófázishoz kötött PM-CD-kel végzett előkísérletek

A permetilezett ciklodextrineket nem csak a mozgófázisban alkalmazzák enantiomerek elválasztására, hanem állófázishoz kötött formában is [162]. Munkám során ebben az irányban is végeztem néhány kísérletet, hogy a kereskedelmi forgalomban levő egységcsomagban megvásárolható ún. „teszt” oszlopokat is kipróbáljam a Norgestrel enantiomerek elválasztására. Ezeket az oszlopokat módszerfejlesztésre szánják, mellyel gyors analízis után megállapíthatjuk, hogy a vizsgált komponensre melyik állófázis lehet a megfelelő. Az alkalmasnak látszó szelektor/állófázis kiválasztása után analitikai méretű oszlopon a kromatográfiás körülmények változtatásával megfelelő módszer fejleszthető.

Kísérleteimet metanol szerves komponens tartalmú mozgófázisban végeztem a mozgófázisban alkalmazott PM-CD-vel kapott (6.3.1. fejezetben bemutatott) eredményekkel történő összehasonlításhoz. Kiindulási körülményként a mozgófázis összetételének 25% (v/v) metanol-víz elegyet választottam, ugyanis ennél a szerves-vizes összetételnél tapasztaltam némi „befűződést”, amely a két enantiomer elválasztására utal; magasabb szerves összetételnél már a két enantiomer nem különböztethető meg, míg alacsonyabb szerves összetételnél túl hosszú analízis idővel eluálódnak az enantiomerek.



42. ábra A Norgestrel enantiomerek elválasztása PM-CD állófázisokon: (a) PM-α-CD, (b) PM-β-CD és (c) PM-γ-CD.

Körülmények: oszlop: Nucleodex α-PM, Nucleodex β-PM, Nucleodex γ-PM (30 x 4 mm, 5 μm); áramlási sebesség: 1 ml/perc, hőmérséklet: 25°C, mozgófázis: 25% (v/v) MeOH vízben, injektált térfogat: 3 μl a 0,1 mg/ml koncentrációjú racém Norgestrel oldatból, detektálás: 244 nm.

A retenciós időket (percben) a csúcsokon tüntettem fel.

A Norgestrel enantiomerek elválasztására végzett előkísérleteim alapján a PM-α-CD állófázis mutat némi lehetőséget módszerfejlesztésre. A PM-β-CD oszlopon nehezen különböztethetők meg az enantiomerek, míg a PM-γ-CD állófázis nem mutat enantiomer szelektivitást (42. ábra). Az enantiomerek nagyon hosszú retenciós idővel eluálódtak, értékelhetetlen csúcsokat kaptam.

A retenciós idő csökkentése érdekében a PM- α -CD állófázison növeltem a hőmérsékletet (40, 50°C-ra), mellyel sikerült az analízis időt lerövidíteni, viszont a csúcsfelbontás és a szelektivitás nem javult.

A PM- α - és a PM- β -CD állófázison a természetes forma (*d*-Norgestrel) eluálódik előbb, míg a PM- γ -CD-n a retenciós sorrend megfordulását tapasztaltam, akárcsak Kummer és munkatársai [162]. További kísérleteket ebben az irányban nem végeztem.

6.3.4. Eredmények, következtetések

A permetilezett ciklodextrinek alkalmazása a mozgófázisban nem mutatott királis felismerést a Norgestrel enantiomerek elválasztásában. A HPLC vizsgálatok nem enantiomer specifikus kötődési állandói egy nagyságrenddel nagyobb számértéket eredményeztek, mint az NMR számításokkal kapott adatok. Ebből arra következtethetünk, hogy a folyadékkromatográfiás vizsgálatok adataiból számított kötődési állandók a királis szelektorok állófázishoz való erős kötődését számszerűsíthetik inkább, mint a királis szelektor/Norgestrel komplex kialakulását. Az NMR számításokból kapott értékek, tisztán, az oldatfázisban lejátszódó királis szelektor/Norgestrel komplexek kialakulására jellemzőek, melyek igen gyenge kötődést mutatnak.

Mivel a bemutatott titrálások során általában gyenge komplexképzést ($K < 100$) tapasztaltunk, nem volt értelme NOE típusú méréseket végezni, korlátozott szerkezeti információt a $\Delta\delta$ értékek összehasonlításából próbáltunk nyerni.

A PM- α -CD-vel történő NMR vizsgálatok során a H4 olefinjel nagymértékű kémiai eltolódásából arra következtettünk, hogy az A gyűrű a többinél jelentősebb szerepet játszik a zárványkomplex képződésében, míg a PM- γ -CD-nél a D gyűrű és az acetilénsoport domináns szerepe figyelhető meg, hasonlóan a natív γ -CD-hez. Az α_c értékek ugyan minden esetben nagyobbak 1-nél, ennek ellenére a kis komplexstabilitási értékek miatt nem kaptam királis elválasztást HPLC-ben. Míg az enantiomerek közül általában a természetes forma (*d*-Norgestrel) képez stabilabb komplexet, addig a PM- α - és a PM- β -CD-vel végzett NMR kísérlet az enantiomer-preferencia megfordulását mutatta.

A PM-CD állófázisokon végzett előkísérletekből megállapítottam, hogy a legkisebb üregméretű PM- α -CD-vel esély látszik arra, hogy a Norgestrel enantiomerek megfelelő módszerfejlesztéssel elválaszthatók legyenek. Ezekből a vizsgálatokból azt is megállapítottam, hogy a natív CD-kkel szemben, az enantiomerek elúciós sorrendjében csere

történik, vagyis a gyógyászatilag nem kedvező királis szennyezés eluálódik elsőként, ami a pontos mennyiségi meghatározás szempontjából fontos.

A mozgófázisban és az állófázishoz kötött formában alkalmazott permetilezett ciklodextrin királis szelektorok viselkedése jelentős különbséget mutat; más-más erősségű és típusú kölcsönhatások alakulnak ki a szelektorok és a vizsgált komponensek között. Előkísérleteim alapján ezek a megfigyelések azt is jelentik, hogy a jelenségek megértéséhez, a komplexek szerkezetének és a stabilitási, kötődési állandók számításához mind a HPLC, mind az NMR kutatások mélyebb és alaposabb vizsgálata szükséges.

7. Összefoglalás

A gyógyszergyártásban, gyógyszerkutatásban nagy igény mutatkozik a folyamatok felgyorsítására. Ezért szükség van olyan hatékony analitikai, elválasztástechnikai módszerek kidolgozására, melyek a lehető leggyorsabban megadják a választ a feltett kérdésekre mind a kutatás-fejlesztés, mind a gyógyszerellenőrzés során. Emiatt megnőtt a jelentősége a gyors kromatográfia alkalmazásának, melynek egyik ígéretes képviselője az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia (HTLC). Doktori dolgozatom témájául ezért szteroid molekulák királis és akirális körülmények között, emelt hőmérsékleten történő viselkedésének tanulmányozását tűztem ki célul.

Az irodalmi részben összefoglaltam az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia elméleti összefüggéseit és a gyakorlatban történő alkalmazásának lehetőségeit, annak előnyeit és hátrányait. Áttekintést adtam elsősorban a mozgófázisban alkalmazott ciklodextrin királis szelektorok elméleti és gyakorlati megvalósításáról, és beszámoltam a kialakult zárványkomplexek vizsgálati módjairól, lehetőségeiről. Az általam vizsgált Levonorgestrel hatóanyag irodalomból ismert akirális és királis analitikai módszereit is bemutattam.

Az emelt hőmérsékleten végzett akirális kutatásaimhoz a Levonorgestrel hatóanyagot és célzottan kiválasztott szennyezéseit alkalmaztam. Korszerű, emelt hőmérsékletre kifejlesztett cirkónium-dioxid alapú állófázison vizsgáltam a kromatográfias paraméterek, körülmények (hőmérséklet, szerves komponens minősége és mennyisége, áramlási sebesség) hatását a modell vegyületek viselkedésén keresztül. Eredményeim igazolták, hogy a mozgófázisban használt metanol és acetonitril szerves oldószerek eltérő kölcsönhatásából adódó szelektivitási különbségek jól érvényesülnek magasabb hőmérséklet-tartományban is. A kapott adatokból az is megállapítható, hogy mindkét oldószer kiválóan alkalmas – más-más

szelektivitással – a gyors analízis elvégzésére, átszámolással egymást akár helyettesíthetik is. Megállapítottam, hogy a folyadékkromatográfia elméleti feltételei emelt hőmérsékleten (50–150°C) is biztonsággal alkalmazhatók. Sikerült egy igen gyors elválasztási rendszert kidolgoznom, mellyel a Levonorgestrel és 5 szennyezése rövid (2,0 – 2,5 perc) analízis idővel vizsgálható [163,165]. Az általam javasolt módszer megfelelő fejlesztéssel alkalmas lehet a jövőben a Levonorgestrel hatóanyag tisztaságvizsgálatára és gyógyszerkészítményekben történő szelektív és gyors hatóanyag-tartalom mérésére is.

A királis gyógyszer hatóanyagokban – mint a Levonorgestrel is – szükséges és kötelező az előforduló enantiomer szennyezés(ek) pontos mennyiségi meghatározása, melyre számos, irodalomban található módszer áll rendelkezésünkre. Ennek részleteit és példákat is összefoglaltam az irodalmi áttekintésben. Az irodalmi adatokat és a Richterben végzett korábbi tapasztalatokat is figyelembe véve, a Norgestrel enantiomerek folyadékkromatográfiás elválasztásakor kiterjesztett hőmérséklet-tartományban vizsgáltam a mozgófázisban alkalmazott különböző natív CD-k hatását, valamint néhány kísérletet is végeztem a permetilezett CD származékok mozgó- és állófázisban való alkalmazására.

A mozgófázisban alkalmazott α - és β -ciklodextrin királis szelektor nem eredményezett enantiomer elválasztást, melyre az NMR technikával, a megfelelő jelek (H4 olefinproton, H21 acetilén- és H19 metilénjel) titrálási görbéinek kiértékelésével, valamint a kötődésvizsgálatok adatai alapján kaptunk magyarázatot. Az α -CD szelektor használata nem okozott retenciós idő változást (csökkenést) a HPLC elválasztásokban. Ezt alátámasztották az ^1H NMR titrálások alapján meghatározott stabilitási állandók is, mivel nagyon kicsi a komplex stabilitása ($K < 5$) – 1:1 arányú komplexet feltételezve –, ami nem elegendő az enantiomerek folyadékkromatográfiás elválasztásához [164].

A β -CD királis szelektor alkalmazásakor kialakult ugyan a zárványkomplex, melyet a HPLC elválasztásokban kapott jelentősebb mértékű retenciós idő csökkenés is jelez a CD nélküli rendszerben kapott retenciós időhöz viszonyítva, azonban királis felismerés nem történt, mindkét enantiomer azonos csúcsban eluálódott. Az ^1H NMR titrálások során jel kettőződést tapasztaltunk mindhárom vizsgált jelen, de a különböző hőmérsékleteken (25, 40, 50°C) kapott becsült stabilitási állandók értékei kicsik ($K < 70$) a sikeres HPLC elválasztáshoz [164]. Az irodalomban elsőként sikerült valószínűsíteni a 2:1 arányú komplex képződését β -CD és Norgestrel között az 1:1 arányú komplex keletkezése mellett, Job módszere szerinti sztöchiometriai vizsgálattal [164].

A natív ciklodextrinek közül a nagyobb üregméretű γ -CD megfelelő volt a Norgestrel enantiomerek elválasztásához. A különböző kromatográfiás paraméterek változtatásának hatását vizsgálva megállapítottam, hogy a mozgófázis alacsonyabb szerves összetétele, a nagyobb γ -CD koncentráció és az alacsonyabb hőmérséklet kedvez az enantiomerek egymás melletti megkülönböztetésének. Enantiomer specifikus kötődési állandókat (K_d , K_l) és királis szelektivitás (α_c) értékeket számoltunk és adtunk meg a HPLC elválasztások és az ^1H NMR titrálások különböző hőmérsékleteken kapott eredményeiből [164]. A két független technikával kapott eredmények, különösen az α_c királis szelektivitás értékek nagyon jó egyezést mutatnak [164]. Megállapítottuk, hogy különböző hőmérsékleteken mind a K stabilitási állandóknak, mind az α_c hányadosuknak megfelelő határérték ($K > 200$, $\alpha_c > 1,1$) felett kell lennie a sikeres kromatográfiás elválasztás előrejelzéséhez [164]. A HPLC adatok és az ^1H NMR titrálások Jobb módszere szerinti sztöchiometriai tanulmányozása alapján az 1:1 arányú zárványkomplex képződését állapítottuk meg. Végül a d -Norgestrel/ γ -CD komplex szerkezetéről 2D NOESY és ROESY spektrumok segítségével kaptunk információt.

A natív CD-k vizsgálatai alapján kísérleteket végeztem a megfelelő permetilezett származékokkal (PM-CD) is, melyeket először a mozgófázisban alkalmaztam. A HPLC eredmények alapján megállapítottam, hogy mindhárom származék és a Norgestrel között létrejön a kapcsolat, jelentős mértékű retenciós idő csökkenést mértem a szelektor nélküli rendszerhez képest, de királis felismerés a két enantiomer között nem jött létre. Mind a HPLC, mind az NMR mérési adatokból stabilitási, kötődési állandókat számítottunk. A HPLC mérésekből számolt nem enantiomer specifikus kötődési állandók egy nagyságrenddel nagyobb értéket eredményeztek az NMR számítási adatokhoz képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a folyadékkromatográfiás vizsgálatok adataiból számított kötődési állandók a királis szelektorok állófázishoz való erős kötődését számszerűsíthetik inkább, mint a királis szelektor/Norgestrel komplex kialakulását. Az NMR számításokból kapott értékek, tisztán, az oldatfázisban lejátszódó királis szelektor/Norgestrel komplexek kialakulására jellemzőek, melyek igen gyenge kötődést mutatnak. A PM-CD állófázisokon végzett előkísérletekből megállapítottam, hogy a legkisebb üregméretű PM- α -CD-vel esély látszik arra, hogy a Norgestrel enantiomerek megfelelő módszerfejlesztéssel elválaszthatók legyenek. Ezekből a vizsgálatokból azt is megállapítottam, hogy a natív CD-kkel szemben, az enantiomerek elúciós sorrendjében csere történik, vagyis a gyógyászatilag nem kedvező királis szennyezés eluálódik elsőként, ami a pontos mennyiségi meghatározás szempontjából fontos.

Az előkísérletekből az is megállapítható, hogy érdemes lehet tovább folytatni a kutatásokat a PM-CD származékokkal is a komplexek stabilitási, kötődési állandóinak meghatározására, a komplexek szerkezetének felderítéséhez mind a HPLC, mind az NMR technikákkal.

8. Tézisek, új tudományos eredmények

1. Korszerű, emelt hőmérsékletre kifejlesztett cirkónium-dioxid alapú állófázison elsőként dolgoztam ki egy igen gyors elválasztási rendszert (2 – 2,5 perces analízis idő) a Levonorgestrel és 5 szennyezésének elválasztására a kromatográfiás paraméterek, körülmények (hőmérséklet, mozgófázis szerves összetevő minősége és mennyisége, áramlási sebesség) változtatásával [163,165]. A javasolt módszer megfelelő továbbfejlesztéssel alkalmas lehet a jövőben a Levonorgestrel hatóanyag tisztaságvizsgálatára és gyógyszerkészítményekben történő szelektív és gyors hatóanyag-tartalom mérésére is.
2. Eredményeimmel igazoltam, hogy a mozgófázisban használt metanol és acetonitril szerves oldószerek eltérő kölcsönhatásából és tulajdonságából adódó szelektivitási különbségek jól érvényesülnek magasabb hőmérséklet-tartományban is. Elsőként állapítottam meg a Levonorgestrel és szennyezéseinek vizsgálata alapján, hogy az érvényes folyadékkromatográfiás elméleti összefüggések (van Deemter, van't Hoff egyenletek) emelt hőmérsékleten (50–150°C) is biztonsággal alkalmazhatók metanolos mozgófázisban [163,165]. Megállapítottam és igazoltam, hogy emelt hőmérséklet-tartományban is érvényesek a hasonló szerkezeti tulajdonságok, a retenciós paraméterek és a termodinamikai állandók közötti összefüggések Levonorgestrelre és hasonló szerkezetű szennyezéseire, valamint a retenciós idők előre jelezhetők.
3. NMR technikával elsőként mértük a megfelelő jelek (H4 olefinproton, H19 acetilén- és H21 metilénjel) titrálási görbéin és kötődési vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a különböző hőmérsékleteken alkalmazott α - és β -ciklodextrin királis szelektorokkal kis stabilitási állandójú komplexek képződnek. A kapott adatok magyarázatot adtak arra, hogy a folyadékkromatográfiában a Norgestrel enantiomerek miért nem választhatók el egymástól ezekkel a királis szelektorokkal [164].

4. Az irodalomban elsőként sikerült valószínűsíteni a 2:1 arányú komplex képződését Norgestrel és β -CD között az 1:1 arányú komplex keletkezése mellett, Job módszere szerinti sztöchiometriai vizsgálattal [164].
5. Elsőként számoltunk és adtunk meg különböző hőmérsékleteken enantiomer-specifikus stabilitási állandókat (K_d , K_l) és királis szelektivitás (α_c) értékeket a γ -CD királis szelektorrall történő HPLC elválasztások és az ^1H NMR titrálások eredményeiből [164]. A két független technikával kapott eredmények, különösen az α_c királis szelektivitás értékek nagyon jó egyezést mutatnak [164]. Megállapítottuk, hogy különböző hőmérsékleteken mind a K stabilitási állandóknak, mind az α_c hányadosuknak megfelelő határérték ($K > 200$, $\alpha_c > 1,1$) felett kell lennie a sikeres kromatográfiás elválasztás előrejelzéséhez.

9. Irodalomjegyzék

- [1] R.J. Maggs, in: A. Zlatkis (Ed.), *Advances in Chromatography*, Preston, Evanston, IL, 1969, 303 – 309.
- [2] F.D. Antia, Cs. Horvath; *J. Chromatogr.* **435** (1988) 1.
- [3] J.A. Blackwell, P.W. Carr; *J. Liquid Chrom.* **14** (15) (1991) 2875.
- [4] C. Zhu, D.M. Goodall, S.A.C. Wren; *LCGC North America*, 23 (2005) 1.
- [5] H.A. Claessens, M.A. van Straten, Reduction of Analysis Time in HPLC at Elevated Column Temperatures, *Eindhoven University of Technology*, 2004
- [6] P.T. Jackson and P.W. Carr; *Chemtech* **28** (10) (1988) 29.
- [7] T. Greibrokk, T. Andersen; *J. Chromatogr. A* **1000** (2003) 743.
- [8] Fekete Jenő, Fekete Szabolcs; *Magyar Kémiai Folyóirat*, **119** (1) (2013) 28.
- [9] G. Guiochon, A. Feller, D.G. Shirazi, A.M. Katti, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography Academic Press*, Amsterdam, 2006, 60.
- [10] Y. Xiang, B. Yan, B. Yue, C.V. McNeff, P.W. Carr, M.L. Lee; *J. Chromatogr. A* **983** (2003) 83.
- [11] J. Li and P.W. Carr; *Anal. Chem.*, **69** (5) (1997) 837.
- [12] C.R. Wilke, P. Chang; *Am. Inst. Chem. Eng. J.* **1** (1955) 264.
- [13] Y. Yang, L.J. Lamm, P. He, T. Kondo; *J. Chromatogr. Sci.* **40** (2) (2002) 107.
- [14] H. Colin, J.C. Diez-Masa, G. Guiochon, T. Czajkowska, I. Miedziak; *J. Chromatogr.* **167** (1978) 41.
- [15] J. Chmielewicz, H. Sawatzky; *J. Chromatogr. Sci.* **17** (5) (1979) 245.
- [16] A. Tchaplal, S. Heron, H. Colin, G. Guiochon; *Anal. Chem.* **60** (14) (1988) 1443.
- [17] L.A. Cole, J.G. Dorsey; *Anal. Chem.* **64** (13) (1992) 1317.
- [18] L.A. Cole, J.G. Dorsey, K.A. Dill; *Anal. Chem.* **64** (13) (1992) 1324.
- [19] T. Yarita, R. Nakajima, M. Shibukawa; *Anal. Sci.* **19** (2) (2003) 269.
- [20] S. Shen, H. Lee, J. McCaffrey, N. Yee, C. Senanayake, N. Grinberg; *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **29** (19) (2006) 2823.
- [21] Y. Liu, N. Grinberg, K.C. Thompson, R.M. Wenslow, U.D. Neue, D. Morrison, T.H. Walter, J.E. O’Gara, K.D. Wyndham; *Anal. Chim. Acta* **554** (2005) 144.
- [22] D. Guilleme, S. Heinisch, J.L. Rocca; *J. Chromatogr. A* **1052** (2004) 39.
- [23] B.A. Bidlingmeyer, J. Henderson; *J. Chromatogr. A* **1060** (2004) 187.

- [24] R.M. Smith; *J. Chromatogr. A* **1184** (2008) 441.
- [25] H. Poppe, J.C. Kraak, J.F.K. Huber, J.H.M. van den Berg; *Chromatographia* **14** (9) (1981) 515.
- [26] H. Poppe, J.C. Kraak, *J. Chromatogr.* **282** (1983) 399.
- [27] G. Vanhoenacker, A.D.S. Pereira, T. Kotsuka, D. Cabooter, G. Desmet, P. Sandra; *J. Chromatogr. A* **1217** (19) (2009) 3217.
- [28] S.M. Fields, C.Q. Ye, D.D. Zhang, B.R. Branch, X.J. Zhang, N. Okafe; *J. Chromatogr. A* **913** (2001) 197.
- [29] T. Teutenberg, H.-J. Goetze, J. Tuerk, J. Ploeger, T.K. Kiffmeyer K.G. Schmidt, W.gr. Kohorst, T. Rohe, H.-D. Jansen, H. Weber; *J. Chromatogr. A* **1114** (1) (2006) 89.
- [30] L. Spearman, R.M. Smith, S. Dube; *J. Chromatogr. A* **1060** (2004) 147.
- [31] S.A.S. Corporation, The Metalox™ 200°C, <http://www.sascorp.jp/concern.html> (2014. 04. 07.)
- [32] Selerity Technologies Inc., Series 9000 Total Temperature Controller, http://www.selerity.com/main/main_products_hplc_9000.html (2014. 04. 07.)
- [33] G. Vanhoenacker, P. Sandra; *J. Scep. Sci.* **29** (12) (2006) 1822.
- [34] Y.-F. Cheng, T.H. Walter, Z. Lu, P.C. Iraneta, B.A. Alden, C. Gendreau, U.D. Neue, J.M. Grassi, J.L. Carmody, J.E. O’Gara, R.P. Fisk; *LC-GC* **18** (11) (2000) 1162.
- [35] J.J. Kirkland, F.A. Truszlowski, C.H. Dilks Jr., G.S. Engle; *J. Chromatogr. A* **890** (1) (2000) 3.
- [36] B.E. Boyes, J.J. Kirkland; *Pept. Res.* **6** (5) (1993) 249.
- [37] W.S. Hancock, R.C. Choupek, J.J. Kikrkland, L.R. Snyder; *J. Chromatogr. A* **686** (1) (1994) 31.
- [38] R.C. Chouplek, W.S. Hancock, B.A. Marchylo, J.J. Kirkland, B.E. Boyes, L.R. Snyder; *J. Chromatogr. A* **686** (1) (1994) 45.
- [39] H. Chen, C. Horvath; *J. Chromatogr. A* **705** (1) (1995) 3.
- [40] K. Kalghatgi, C. Horvath; *J. Chromatogr. A* **443** (1988) 343.
- [41] C.J. Dunlap, C.V. McNeff, D. Stoll, P.W. Carr; *Anal. Chem.* **73** (21) (2001) 598A
- [42] S.J. Marin, B.A. Jones, W.D. Felix, J. Clark; *J. Chromatogr. A* **1030** (2004) 255.
- [43] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr; *J. Chromatogr. A* **1028** (1) (2004) 1.
- [44] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick; *J. Chromatogr. A* **1028** (1) (2004) 31.

- [45] J. Li and P.W. Carr; *Anal. Chem.* **69** (11) (1997) 2193.
- [46] J. Li and P.W. Carr; *Anal. Chem.* **68** (17) (1996) 2857.
- [47] B. Yan, J. Zha, J.S. Brown, J. Blackwell and P.W. Carr; *Anal. Chem.* **72** (6) (2000) 1253.
- [48] A.M. Clausen and P.W. Carr; *Anal. Chem.*, **70** (2) (1998) 378.
- [49] C.Mc. Neff, L. Zigan, K. Johnson, P.W. Carr, A. Wang, A.M. Weber-Main; *LC LC-GC* **18** (5) (2000) 514.
- [50] J. Li, Y. Hu, P.W. Carr; *Anal. Chem.* **69** (19) (1997) 3884.
- [51] S. Yamaki, T. Isobe, T. Okuyama, T. Shinoda; *J. Chromatogr. A* **728** (1996) 189.
- [52] P. He, Y. Yang; *J. Chromatogr. A* **989** (1) (2003) 55.
- [53] T. Teutenberg, J. Tuerk, M. Holzhauser, S. Giegold; *J. Sep. Sci.* **30** (8) (2007) 1101.
- [54] S.J. Martin, B.A. Jones, W.D.Felix, J. Clark; *J. Chromatogr. A* **1030** (2004) 255.
- [55] H.A. Claessens, M.A. van Straten; *J. Chromatogr. A* **1060** (2004) 23.
- [56] G. Vanhoenacker, P. Sandra; *J. Chromatogr. A* **1082** (2) (2005) 193.
- [57] T.S. Kephart, P.K. Dasgupta; *Anal. Chim. Acta* **414** (2000) 71.
- [58] M.M. Sanagi, H.H. See, W.A.W. Ibrahim, A.A. Naim; *J. Chromatogr. A* **1059** (2004) 95.
- [59] M.M. Sanagi, S.H. Heng, W.A.W. Ibrahim, W. Aini, A.A. Naim; *Malays. J. Chem.* **6** (1) (2004) 55.
- [60] L.A. Riddle, G. Guiochon; *J. Chromatogr. A* **1137** (2) (2006) 173.
- [61] L.A. Al-Khateeb, R.M. Smith; *Anal. Bioanal. Chem.* **394** (5) (2009) 1255.
- [62] C.V. McNeff, B. Yan, D.R. Stoll, R.A. Henry; *J. Sep. Sci.* **30** (11) (2007) 1672.
- [63] S. Giegold, M. Holzhauser, T. Kiffmeyer, J. Tuerk, T. Teutenberg, M. Rosenhagen, D. Hennies, T. Hoppe-Tichy, B.Wenclawiak; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **46** (4) (2008) 625.
- [64] Dao T.-T. Nguyen, D. Guillarme, S. Heinisch, M.-P. Barrioulet, J.-L. Rocca, S. Rudaz, J.-L.Veuthey; *J. Chromatogr. A* **1167** (1) (2007) 76.
- [65] J.D. Thompson, P.W. Carr; *Anal. Chem.* **74** (5) (2002) 1017.
- [66] T. Tsuda, S. Kitagawa, T. Umeyama, S. Araki, T. Hirashita, M. Aoki, K. Nakamura; *Anal. Sci.* **22** (3) (2006) 479.
- [67] J. Szejtli, Cyclodextrins and their inclusion complexes, *Akadémia Kiadó*, Budapest, 1982

- [68] D. French; *Adv. Carbohydr. Chem.* **12** (1957) 189.
- [69] J. Szejtli, Cyclodextrin technology, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, 1988
- [70] Szejtli József; *Magyar Kémikusok Lapja*, **45** (3-4) (1990) 98.
- [71] W. Saenger, M. Noltemeyer, P.C. Manor; *Bioorganic Chemistry*, **5** (2) (1976) 187.
- [72] K. Linder, W. Saenger; *Acta Crystallographica B*, **38** (1) (1982) 203.
- [73] G. Bettinetti, Cs. Novák, M. Sorrenti; *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, **68** (2) (2002) 517.
- [74] Fenyvesi É., Szejtli J., Zsádon B.; *Magyar Kémikusok Lapja*, **45** (3-4) (1991) 114.
- [75] K.A. Connors; *Chem. Rev.* **97**, (5) (1997) 1325.
- [76] T. Higuchi, K. Connors; *Adv. Anal. Chem. Instrum.* **4**, (1965) 117.
- [77] W. Al-Soufi, P.R. Cabrer, A.Jover, R.M. Budal, J.V. Tato; *Steroids* **68** (2003) 43.
- [78] Sz. Béni, Z. Szakács, O. Csernák, L. Barcza, B. Noszál; *Eur. J. Pharm. Sci.* **30** (2007) 167.
- [79] Lamcharfi E., Chulion S., Kerbal A., Kunesch G., Libot F., Virelizier H.; *J. Mass Spectrom.* **31** (1996) 982.
- [80] B. Chankvetadze, G. Pintore, N. Burjanadze, D. Bergenthal, K. Bergander, J. Breitkreuz, C. Mühlenbrock, G. Blaschke; *J. Chromatogr. A* **875** (2000) 455.
- [81] P. Sohár, *Mágneses magrezonancia spektroszkópia*. Akadémiai Kiadó, Budapest, (1976) 40.
- [82] P.K. Owens, A.F. Fell, M.W. Coleman, J.C. Berridge; *J. Chromatogr. A* **797** (1998) 149.
- [83] P.K. Owens, A.F. Fell, M.W. Coleman, M. Kinns, J.C. Berridge; *J. Pharm Biomed. Anal.* **15** (9-10) (1997) 1603.
- [84] G. Tárkányi; *J. Chromatogr. A* **961** (2) (2002) 257.
- [85] L. Fielding; *Tetrahedron* **56** (34) (2000) 6151.
- [86] G. Uccello-Barretta, L. Vanni, F. Balzano; *J. Chromatogr. A* **1217** (7) (2010) 928.
- [87] Job P.; *Annales de Chimie* **9** (1928) 113.
- [88] V.M.S. Gil, N.C. Oliveira; *J. Chem. Educ.* **67** (1990) 473.
- [89] Y.L. Loukas; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **16** (1997) 275.
- [90] S. Letellier, B. Maupas, J.P. Gramond, F. Guyon, P. Gareil; *Anal. Chim. Acta* **315** (1995) 357.

- [91] C. Cabaleiro-Lago, M. Nilsson, A.J.M. Valente, M. Bonini, O. Söderman; *J. Colloid Interf. Sci.* **300** (2006) 782.
- [92] E.C. Kempen, J.S. Brodbelt; *Anal. Chem.* **72** (2000) 5411.
- [93] A. Bielejewska, M. Kozbial, R. Nowakowski, K. Duszczek, D. Sybilska; *Anal. Chim. Act.* **300** (1995) 201.
- [94] K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanaga, T. Ando; *Anal. Chem.* **58** (13) (1986) 2668.
- [95] H.J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger, H. Ikeda; *Chem. Rev.* **98** (5) (1998) 1755.
- [96] B. Chankvetadze; *Chem. Soc. Rev.* **33** (6) (2004) 337.
- [97] H. Dodziuk, A. Ejchart, O. Lukin, M.O. Vysotsky; *J. Org. Chem.* **64** (1999) 1503.
- [98] C.M. Fernandes, R.A. Carvalho, S.P. da Costa, F.J.B. Veiga; *Eur. J. Pharm. Sci.* **18** (5) (2003) 285.
- [99] H. Dodziuk, K.S. Nowinski, W. Kozminski, G. Dolgonos; *Org. Biomol. Chem.* **1** (2003) 581.
- [100] M.V. Rekharsky, Y. Inoue; *Chem. Rev.* **98** (5) (1998) 1875.
- [101] I. Tabushi, Y. Kiyosuke, T. Sugimoto, K. Yamamura; *J. Am. Chem. Soc.* **100** (3) (1978) 916.
- [102] M.M. Al Omari, M.B. Zuhgul, J.E.D. Davies, A.A. Badwan; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41** (3) (2006) 857.
- [103] W. Chen, C.-E. Chang, M.K. Gilson; *Biophys. J.* **87** (5) (2004) 3035.
- [104] P. Lo Meo, F. D'Anna, M. Gruttadauria, S. Riela, R. Noto; *Tetrahedron* **60** (41) (2004) 9099.
- [105] M.V. Rekharsky, R.N. Goldberg, F.P. Schwarz, Y.B. Tewari, P.D. Ross, Y. Yamashoji, Y. Inoue; *J. Am. Chem. Soc.* **117** (34) (1995) 8830.
- [106] N. Sadlej-Sosnowska; *J. Chromatogr. A* **728** (1996) 89.
- [107] G. Tárkányi, K. Németh, R. Mizsei, O. Tőke, J. Visy, M. Simonyi, L. Jicsinszky, J. Szemán, L. Szenté; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **72** (2013) 292.
- [108] A. Zoppi, M.A. Quevedo, M.R. Longhi; *Bioorg. Med. Chem.* **16** (18) (2008) 8403.
- [109] A. Hazekamp, R. Verpoorte; *Eur. J. Pharm. Sci.* **29** (5) (2006) 340.
- [110] T. Brand, E.J. Cabrita, S. Berger; *Progr. Nucl. Magn. Reson. Spectr.* **46** (4) (2005) 159.
- [111] A. Jover, R.M. Budal, W. Al-Soufi, F. Meijide, J.V. Tato, R.A. Yunes; *Steroids* **68** (1) (2003) 55.

- [112] A. Bielejewska, R. Nowakowski, K. Duszczuk, D. Sybilska; *J. Chromatogr. A* **840** (2) (1999) 159.
- [113] M. Asztemborska, A. Bielejewska, K. Duszczuk, D. Sybilska; *J. Chromatogr. A* **874** (1) (2000) 73.
- [114] G. Uccello-Barretta, F. Balzano, R. Menicagli, P. Salvadori; *J. Org. Chem.* **61** (1) (1996) 363.
- [115] M. Kyvala, I. Lukes (1995): OPIUM computer program.
<http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/opium.html> (2014. 04. 07.)
- [116] Z. Juvancz, J. Szejtli; *TrAC Trends Anal. Chem.* **21** (5) (2002) 379.
- [117] CDNEWS, Cyclolab Ltd., H-1525, Budapest P.O.B. 435, Budapest, Hungary
- [118] W.A. König, *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*, Hüthig Verlag, Heidelberg, Germany, 1992
- [119] Z. Juvancz, V. Schuring, K. Grolimund; *J. Microcol. Sep.* **5** (5) (1993) 459.
- [120] J. Debowski, D. Sybilska, J. Jurczak; *J. Chromatogr.* **237** (2) (1982) 303.
- [121] D.W. Armstrong, C.D. Chang, S.H. Lee; *J. Chromatogr. A* **539** (1991) 83.
- [122] T.J. Ward, D.W. Armstrong; *J. Liq. Chromatogr.* **9** (1986) 407.
- [123] J. Haginaka, J. Wakai; *Anal. Chem.* **62** (1990) 997.
- [124] A. Stalcup, K.L. Williams; *J. Liq. Chromatogr.* **15** (1992) 29.
- [125] M.E. Franks, G.R. Macpherson, W.D. Figg; *The Lancet*, **363** (2004) 1802.
- [126] M. Wedig, S. Laug, T. Christians, M. Thunhorst, U. Holzgrabe; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27** (3-4) (2002) 531.
- [127] M. Okamoto; *J. Pharm. And Biomed. Anal.* **27** (2002) 401.
- [128] B.-A. Persson, S. Andersson; *J. Chromatogr. A* **906** (2001) 195.
- [129] L. Chankvetadze, N. Ghibradze, M. Karchkhadze, L. Peng, T. Farkas, B. Chankvetadze; *J. Chromatogr. A*, **1218** (37) (2011) 6554.
- [130] A. Péter, G. Török, D.W. Armstrong, G. Tóth, D. Tourwé; *J. Chromatogr. A* **828** (1998) 177.
- [131] A. Péter, E. Vékes, D.W. Armstrong; *J. Chromatogr. A* **958** (2002) 89.
- [132] Ivanildo Jos'e da Silva Junior, João Paulo Sartor, Paulo César Pires Rosa, Vinícius de Veredas, Amaro Gomes Barreto Júnior, Cesar Costapinto Santana; *J. Chromatogr. A* **1162** (2007) 97.
- [133] J.M. Cunliffe, D.P. Dreyer, R.N. Hayes, R.P. Clement, J.X. Shen; *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **54** (2011) 179.

- [134] P.K. Zarzycki, M. Wierzbowska, H. Lamparczyk; *J. Pharm. And Biomed. Anal.* **16** (1997) 1281.
- [135] H. Lamparczyk, P.K. Zarzycki; *J. Pharm. And Biomed. Anal.* **13** (1995) 543.
- [136] P.K. Zarzycki, M. Wierzbowska, H. Lamparczyk; *J. Pharm. And Biomed. Anal.* **14** (1996) 1305.
- [137] P.K. Zarzycki, E. Włodarczyk, M.J. Baran; *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 7602.
- [138] P.K. Zarzycki, R. Smith; *J. Chromatogr. A* **912** (2001) 45.
- [139] H. Lamparczyk, P.K. Zarzycki, J. Nowakowska; *J. Chromatogr. A* **668** (1994) 413.
- [140] R. Nowakowski, A. Bielejewska, K. Duszczek, D. Sybilska; *J. Chromatogr. A* **782** (1997) 1.
- [141] M. Gazdag, G. Szepesi, L. Huszár; *J. Chromatogr.* **351** (1986) 128.
- [142] M. Gazdag, G. Szepesi, L. Huszár; *J. Chromatogr.* **371** (1986) 227.
- [143] M. Gazdag, G. Szepesi, L. Huszár; *J. Chromatogr.* **436** (1988) 31.
- [144] M. Gazdag, G. Szepesi, K. Mihályfi; *J. Chromatogr.* **450** (1988) 145.
- [145] McBride-WG, *Current Therapeutic Research*; **12** (1970) 391.
- [146] S. Görög, M. Bihari, É. Csizér, F. Dravecz, M. Gazdag, B. Herényi; *J. Pharm. and Biom. Anal.* **14** (1995) 85.
- [147] P. Horváth, G. Balogh, J. Brlik, A. Csehi, F. Dravecz, Zs. Halmos, A. Laukó, M. Rényi, K. Varga, S. Görög; *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **15** (1997) 1343.
- [148] S. Görög, M. Babják, G. Balogh, J. Brlik, F. Dravecz, M. Gazdag, P. Horváth, A. Laukó, K. Varga; *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **18** (1998) 511.
- [149] *USP* **37** (2014) 3542
- [150] *European Pharmacopoeia* **8.0**, 01/2014 0926
- [151] Gazdag M., Takács T., Szöllősi É.; *Acta. Pharm. Hung.* **73** (1) (2003) 23.
- [152] B. Chankvetadze, I. Kartoziya, C. Yamamoto, Y. Okamoto, G. Blaschke; *J. Pharm. and Biomed. Anal.* **30** (6) (2003) 1897.
- [153] J. Ye, G. Chen, S. Zeng; *J. Chrom. B* **843** (2) (2006) 289.
- [154] Szepesi Gábor; *Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) és gyógyszer-analitikai alkalmazása*, Magyar Gyógyszerészeti Társaság, Budapest, 1987, 7.3. fejezet, 130.
- [155] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan; *J. Chromatogr.* **185** (1979) 179.
- [156] *Technical Information & Safe Handling Guide for Methanol*, Version 3.0 (2006. szept.) Methanex Corporation

- [157] A. Botsi, B. Perly, E. Hadjoudis; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1997) 89.
- [158] S. Immel, F.W. Lichtenthaler; *Starch-Stärke* **48** (1996) 225.
- [159] J. Zukowski, D. Sybilska, J. Bojarski, J. Szejtli; *J. Chromatogr.* **436** (1988) 381.
- [160] A. Kwaterczak, A. Bielejewska; *Anal. Chim. Acta* **537** (2005) 41.
- [161] H. Riering, M. Sieber; *J. Chromatogr. A* **728** (1996) 171.
- [162] M. Kummer, H.-J. Palme, G. Werner; *J. Chromatogr. A* **749** (1996) 61.
- [163] Berta Renáta, Babják Mónika, Gazdag Mária: A hőmérséklet szerepe a folyadék-kromatográfiás elválasztásokban, *Magyar Kémikusok Egyesülete Richter gyári csoportjának centenáriumi kiadványa*, **2007** 56.
- [164] R. Berta, Z. Szakács, M. Babják, M. Gazdag; *Chromatographia* **71** (2010) 35.
- [165] R. Berta, M. Babják, M. Gazdag; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **54** (2011) 458.

Rövid összefoglalás

A gyógyszerkutatásban nagy igény mutatkozik a folyamatok felgyorsítására, a hatékony analitikai, elválasztástechnikai módszerek kidolgozására. Emiatt megnőtt a jelentősége a gyors kromatográfia alkalmazásának, melynek egyik ígéretes képviselője az emelt hőmérsékletű folyadékkromatográfia (HTLC).

Doktori munkámban elsődleges célom volt a hőmérséklet hatásának tanulmányozása a Levonorgestrel szteroid hatóanyag akirális és királis HPLC analízise során. Feladatul tűztem ki, hogy *akirális* rendszerben egy nagy áteresztőképességű, gyors analitikai módszert dolgozzak ki emelt hőmérsékleten. A *királis* rendszerben célom volt a Norgestrel enantiomerek folyadékkromatográfias elválasztásának vizsgálata kiterjesztett hőmérséklet-tartományban a mozgófázisban alkalmazott különböző natív ciklodextrin királis szelektorokkal, valamint néhány kísérletet végeztem a permetilezett ciklodextrin származékok mozgó- és állófázisban való alkalmazására is. Célul tűztük ki a királis elválasztás mechanizmusának mélyebb megértését NMR spektroszkópiai módszerek alkalmazásával, a képződő komplex(ek) sztöchiometriájának és stabilitási állandóinak meghatározását, valamint a kötődésért felelős szteroid molekularészletet próbáltuk azonosítani.

Korszerű, emelt hőmérsékletre kifejlesztett cirkónium-dioxid alapú állófázison egy igen gyors elválasztási rendszert dolgoztam ki a Levonorgestrel és 5 szennyezősének elválasztására a kromatográfias paraméterek, körülmények változtatásával. A javasolt módszer megfelelő továbbfejlesztéssel alkalmas lehet a jövőben a Levonorgestrel hatóanyag tisztaságvizsgálatára és gyógyszerkészítményekben történő szelektív és gyors hatóanyag-tartalom mérésére is. Eredményeimmel igazoltam, hogy a mozgófázisban használt metanol és acetonitril szerves oldószerek eltérő kölcsönhatásából adódó szelektivitási különbségek jól érvényesülnek magasabb hőmérséklet-tartományban is. Megállapítottam, hogy a normál hőmérséklet-tartományban érvényes folyadékkromatográfias elméleti összefüggések emelt hőmérsékleten (50–150°C) is biztonsággal alkalmazhatók. Megállapítottam és igazoltam, hogy a hasonló szerkezeti tulajdonságok és a retenciós paraméterek közötti összefüggések Levonorgestrelre és a hasonló szerkezetű szennyezőseire emelt hőmérséklet-tartományban is érvényesek, valamint a retenciós idők előre jelezhetők.

A racém Norgestrel α - vagy β -ciklodextrinekkel, különböző hőmérsékleteken végzett ^1H -NMR titrálásai csak gyenge komplex képződését mutatták, ami megmagyarázza, hogy ezen királis szelektorok HPLC mozgófázisban történő alkalmazása miért nem eredményez

királis elválasztást. Az 1:1 komplex keletkezése mellett korábban ismeretlen 2:1 β -CD/*d*-Norgestrel komplex képződését is sikerült azonosítani Job módszerét alkalmazva. Különböző hőmérsékleten enantiomer specifikus kötődési állandókat (K_d , K_l) és királis szelektivitás (α_c) értékeket számoltunk és adtunk meg a γ -CD királis szelektorról történő HPLC elválasztások és az ^1H NMR titrálások eredményeiből. Megállapítottuk, hogy mind a K stabilitási állandóknak, mind az α_c hányadosoknak megfelelő határérték ($K > 200$, $\alpha_c > 1,1$) felett kell lennie a különböző hőmérsékleten történő kromatográfiás elválasztás előrejelzéséhez.

Summary

There is a high demand in the pharmaceutical research to speed up the process, to develop efficient analytical, separation methods. Thus the importance of the application of fast chromatography has increased, and the high-temperature liquid chromatography (HTLC) is a promising representative of this technique.

The primary aim of my PhD work was to explore the temperature effects on the achiral and chiral HPLC analysis of Levonorgestrel, a steroid active pharmaceutical ingredient (API). My first goal was to develop a rapid, high-throughput *achiral* analytical method at an elevated temperature. In the *chiral* system, my focus was on the LC separation of Norgestrel enantiomers over an extended temperature range using native cyclodextrins (CDs) as chiral selectors. In additional experiments, permethylated CD derivatives were also applied either in the mobile or the stationary phase. To gain more insight into the mechanism of chiral separation, NMR spectroscopic methods were applied to determine the stoichiometry and stability constants of the complex(es) formed, and to identify the molecular fragment(s) of the guest mostly involved in the binding.

By optimizing the liquid chromatographic parameters on a modern, zirconium dioxide-based stationary phase specially manufactured for elevated temperatures, I have developed a rapid method to separate Levonorgestrel and its five impurities from each other. With further optimization this method may enable in the future the impurity profiling of Levonorgestrel API, as well as its selective and rapid determination in drug products. My results prove that the selectivity differences due to dissimilar interactions with the methanol and acetonitrile components of the mobile phase persist at elevated temperatures. The theoretical HPLC relationships (van Deemter and van't Hoff equations) valid in the usual temperature range can be safely applied in the elevated (50–150°C) temperature range. I have verified for Levonorgestrel and its related impurities that the relationships between structural analogs and the retention parameters remain valid at higher temperatures, and the prediction of retention times is feasible.

¹H NMR titrations of racemic Norgestrel with α - or β -CD at various temperatures indicated the formation of weak complexes, thus explaining why these chiral selectors fail to provide chiral separation when applied in the HPLC mobile phase. Besides the expected 1:1 complex, by using Job's method we could verify the formation of a previously unidentified 2:1 β -CD/*d*-Norgestrel complex. For γ -CD, enantiomer-specific binding constants (K_d , K_l) and

chiral selectivities (α_c) were evaluated from both LC chromatograms and the NMR titration curves. We demonstrated that both the K stability constants and their α_c ratios must be above a threshold value ($K > 200$, $\alpha_c > 1.1$) for the successful prediction of chromatographic enantioseparation at various temperatures.